

**Wirkungsweise sexueller Signalstoffe der Zygomyceten  
*Blakeslea trispora* (Choanephoraceae) und *Mucor  
mucedo* (Mucoraceae)**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Diplom-Biologin Mareike Richter**

**geboren am 22. April 1980 in Weimar**

**Gutachter der Dissertation:**

1. Gutachter: Prof. Dr. Wilhelm Boland (Jena)
2. Gutachter: Prof. Dr. Johannes Wöstemeyer (Jena)
3. Gutachter: Prof. Dr. Helmut König (Mainz)

**angenommen am: 13.02.2008**

**Tag der öffentlichen Disputation: 20.05.2008**

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>11</b>
2.1. <i>Pilzliche Pheromone dienen der intraspezifischen, sexuellen Kommunikation</i>	13
2.2. <i>Allgemeine Regulationsprinzipien der zellulären Kommunikation und             spezifische Regulationsprinzipien der Genexpression .....</i>	16
2.3. <i>Trisporsäure-Vorstufen dienen Zygomyceten als Pheromone zur sexuellen             Kommunikation .....</i>	18
2.4. <i>Die Biosynthese der frühen Trisporsäure-Vorstufe <math>\beta</math>-Carotin wird durch             unterschiedliche Faktoren reguliert .....</i>	22
2.5. <i>Verbreitung und sexueller Lebenszyklus von Zygomyceten.....</i>	24
2.6. <i>Ziele.....</i>	27
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>28</b>
3.1. <i>Verwendete Materialien .....</i>	28
3.1.1.    Chemikalien .....	28
3.1.2.    Organismen.....	28
3.2. <i>Kultivierung .....</i>	28
3.2.1.    Stammhaltung.....	28
3.2.2.    Medien .....	29
3.3. <i>Gewinnung natürlicher Trisporoide aus <i>Blakeslea trispora</i> durch Extraktion von             Flüssigkulturen.....</i>	30
3.3.1.    Vorkulturen.....	30
3.3.2.    Kreuzkulturen.....	30
3.3.3.    Extraktion der Trisporsäure und ihrer Vorstufen .....	30
3.3.4.    Photometrische Abschätzung der Trisporoidkonzentrationen .....	31
3.3.5.    Reinigung der Trisporsäure aus Flüssigkulturextrakten durch Säulen- bzw. Dünnschichtchromatographie.....	31

3.4.	<i>Biotests zum Nachweis von flüchtigen Verbindungen und Trisporoiden aus Zygomyceten</i> .....	32
3.4.1.	Zygophorentest mit Trisporoiden und closed loop stripping-Extrakten ...	32
3.4.2.	Nachweis flüchtiger, Zygophoren-induzierender Verbindungen .....	32
3.5.	<i>Chemische Analyse flüchtiger Verbindungen aus Zygomyceten</i> .....	33
3.5.1.	Closed loop stripping zum Anreichern flüchtiger Verbindungen .....	33
3.5.2.	Gekoppelte Gaschromatographie/Massenspektrometrie zur Identifizierung von flüchtigen Verbindungen und Trisporoiden .....	34
3.6.	<i>Lokalisation von Carotinoiden in lebenden Pilzstrukturen mit Raman-Spektroskopie</i> .....	35
3.6.1.	Aufbau der Raman-Spektrometer .....	35
3.7.	<i>Quantitativer Nachweis von <math>\beta</math>-Carotin mit Hochleistungsflüssigchromatographie</i> ..	36
3.7.1.	Kultivierung und Behandlung von Pilzkulturen mit Trisporoiden .....	36
3.7.2.	Carotin-Extraktion .....	38
3.7.3.	Hochleistungsflüssigchromatographie.....	38
3.8.	<i>Analyse der Genexpression mit quantitativer real-time PCR</i> .....	39
3.8.1.	Kultivierung und Behandlung mit Trisporoiden .....	39
3.8.2.	RNA-Isolation .....	39
3.8.3.	Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA.....	39
3.8.4.	Reverse Transkription.....	40
3.8.5.	Real-time PCR .....	40
3.9.	<i>Statistische Berechnungen</i> .....	42
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>44</b>
4.1.	<i>Mucor mucedo Kreuzkulturen produzieren flüchtige Trisporoide</i> .....	44
4.1.1.	Zygophoren-induzierende, gasförmige Wirkstoffe lassen sich im Biotest nachweisen.....	44
4.1.2.	Analytischer Hinweis auf gasförmige Trisporoide .....	46
4.2.	<i>Nachweis und Lokalisation von Carotinoiden mit zweidimensionaler Raman-Spektroskopie</i> .....	50

4.3.	<i>Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen Trisporoiden und Carotinproduktion in <i>Mucor mucedo</i> und <i>Blakeslea trispora</i></i>	54
4.3.1.	Entwicklung der Kultivierungs-, Extraktions- und Meßmethode für den Biotest zur Carotininduktion	54
4.3.2.	Carotinproduktion in Petrischalenkulturen	55
4.3.3.	Trisporosäure B induziert die Carotinproduktion in <i>Mucor mucedo</i> und <i>Blakeslea trispora</i>	57
4.3.4.	Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen Trisporoidanaloga und Carotinsynthese in <i>Mucor mucedo</i> und <i>Blakeslea trispora</i>	60
4.3.5.	Einige Trisporoide induzieren gleichzeitig die Carotinproduktion und Zygothorenbildung in <i>Mucor mucedo</i>	69
4.3.6.	Zusammenfassung der quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehungen in <i>Mucor mucedo</i> und <i>Blakeslea trispora</i> für den Carotinaufbau	71
4.4.	<i>Analyse der Genexpression nach Trisporoidbehandlung</i>	72
4.4.1.	Genexpressionsanalyse in <i>Mucor mucedo</i>	72
4.4.2.	Genexpressionsanalyse in <i>Blakeslea trispora</i>	75
4.4.2.1.	<i>CarB</i> und <i>tsp3</i> sind Gene im Carotinaufbauweg und Carotinabbauweg, die durch Trisporoide transkriptionell reguliert werden	75
4.4.2.2.	Regulativ wirksame Trisporoide beeinflussen die Transkriptlevel von <i>tsp3</i>	79
4.4.2.3.	Manche Trisporoide induzieren gleichzeitig die Carotinproduktion und die <i>tsp3</i> Transkription in <i>Blakeslea trispora</i>	81
4.4.2.4.	Zusammenfassung der quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehungen in <i>Blakeslea trispora</i> für den Carotinabbau	84
5.	<b>Diskussion</b>	85
5.1.	<i>Zygomyceten produzieren flüchtige Verbindungen</i>	85
5.2.	<i><i>Mucor mucedo</i> Kreuzkulturen produzieren flüchtige, Zygothoren-induzierende Trisporoide</i>	87
5.3.	<i>Lokalisation von Carotinoiden in lebenden Pilzhyphen mit Raman-Spektroskopie</i>	88
5.4.	<i>Entwicklung eines Biotests zur Carotininduktion in Petrischalenkulturen</i>	89

5.5.	<i>Trisporsäure beeinflusst die Carotinproduktion in Mucor mucedo und Blakeslea trispora</i> .....	91
5.6.	<i>Unterschiedliche Trisporoide erhöhen die Carotinproduktion in (+) und (-) Kreuzungstypen</i> .....	92
5.7.	<i>Unterschiedliche Trisporoide erhöhen die Carotinproduktion in Mucor mucedo und Blakeslea trispora – „Dialekte“ der chemischen Sprache während der sexuellen Interaktion</i> .....	94
5.8.	<i>Trisporoidanaloga beeinflussen die Carotinproduktion und Zygothorenbildung in Mucor mucedo unterschiedlich</i> .....	96
5.9.	<i>Die Transkription von tsp3 und carB wird durch Trisporsäure induziert</i> .....	98
5.10.	<i>Die Transkription von hmgR und tsp1 wird nicht durch Trisporsäure beeinflusst</i> .....	103
5.11.	<i>Die Carotinproduktion und Carotinspaltung werden durch gleiche Trisporoide induziert</i> .....	104
5.12.	<i>Induzierende Strukturmerkmale der Trisporoidmoleküle während des Carotinaufbaus und -abbaus in Mucor mucedo bzw. Blakeslea trispora unterscheiden sich</i> .....	106
<b>6.</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>111</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>117</b>

## Abkürzungsverzeichnis

(+)x(-)	Kreuzkultur
µg	Mikrogramm
4-DHT	4-Dihydrotrispurin
4-DHMT	4-Dihydromethyltrispurin
A. dest.	Quarz destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
amu	Atommassen
<i>B. trispora</i>	<i>Blakeslea trispora</i>
bp	Basenpaar
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	kopierte Desoxyribonukleinsäure
CLS	closed loop stripping
CoA	Coenzym A
D	Durchmesser
DAD	Dioden-Array-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FG	Frischgewicht
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
h	Stunde
H	Höhe
HMG	Hydroxymethylglutaryl
K	Grad Kelvin
<i>M. mucedo</i>	<i>Mucor mucedo</i>
m/z	Verhältnis von Masse zu Ladung
MAP Kinase	Mitogen-aktivierte-Protein Kinase
mg	Milligramm
n	Anzahl der Durchführungen einer Messreihe
N	Stickstoff
n.s.	nicht signifikant
Nd:YAG	Neodym Yttrium Aluminium Granat
NEB	New England Biolabs
ng	Nanogramm
PCR	Polymerasekettenreaktion
KA	Proteinkinase A
RNA	Ribonukleinsäure
SPME	Festphasenmikroextraktion
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat (Puffer als wässrige Lösung)
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

## 1. Zusammenfassung

Weltweit verbreitete Vertreter heterothallischer Zygomyceten (Jochpilze), wie *Mucor mucedo* (LINNÉ) und *Blakeslea trispora* (THAXTER), besitzen einen asexuellen und einen sexuellen Lebenszyklus. Die Pheromone der Zygomyceten, sogenannte Trisporoide, dienen während der intraspezifischen, sexuellen Interaktion zur Kommunikation zwischen den (+) und (-) Kreuzungstypen. Die chemische Grundstruktur der Pheromone besteht aus einem C<sub>6</sub> Ring und einer Isoprenoidkette am C(6) des Rings (Abb.A).

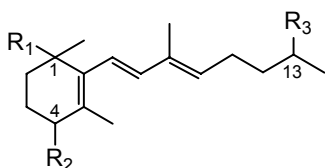


Abb.A: Chemische Grundstruktur der Trisporoidmoleküle, die während der sexuellen Interaktion der beiden Kreuzungstypen einer Zygomycetenart als Pheromone wirken

Die Wirkung der Pheromone tritt nach der Diffusion durch das Substrat oder den Luftraum im Kreuzungspartner auf. Trisporin A (**2**) und B (**3**) wirkten über den Luftraum Zygomyceten-induzierend. Die im Gasraum von *Mucor mucedo* Kreuzkulturen gesammelten Verbindungen lösten eine morphologische Sexualreaktion, die Bildung sogenannter Zygomyceten, in *Mucor mucedo* Einzelkulturen aus. Diese bioaktiven Verbindungen ließen sich daher als flüchtige Pheromone beschreiben. Mittels gekoppelter Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) wurde ein Hinweis gegeben, dass Trisporoid-Verbindungen, wie z.B. das Ketotrisporoid (R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=O) (**11**), über den Gasraum von *Mucor mucedo* Kreuzkulturen wirken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden morphologische, metabolische und genetische Merkmale der Zygomyceten genutzt, um Aussagen zur Wirkung synthetischer und isolierter Trisporoide zu treffen. Die gemeinsame Betrachtung der verschiedenen Wirkungsebenen lieferte ein Gesamtbild und ermöglichte Schlussfolgerungen über das strukturelle Aktivitätsprinzip der Trisporoide.

Die zweidimensionale Raman-Spektroskopie wurde für die optische Darstellung der Verteilung von  $\beta$ -Carotin in lebenden Hyphen von *Mucor mucedo* genutzt.  $\beta$ -Carotin trat gleichmäßig verteilt in den asexuellen und sexuellen Hyphen auf. Die Induktion der Carotinproduktion durch synthetische Trisporoidanaloga (Abb.14) diente der Bestimmung umfangreicher Struktur-Wirkungs-Beziehungen in Myzelkulturen von *Mucor mucedo* (Mucorales, Mucoraceae) und *Blakeslea trispora* (Mucorales,



Choanaeophoraceae). Die Applikation der Trisporoidanaloge auf einen Kreuzungstyp simulierte dabei die sexuelle Kommunikation. Die Ergebnisse dieses Biotests zur Carotininduktion zeigten, dass spezifische Trisporoid-Verbindungen potentielle Signalmoleküle in den pilzlichen Kreuzungstypen und Arten sind. Für die Induktion der Carotinproduktion in *Mucor mucedo* und *Blakeslea trispora* war die Ketogruppe am C(4) des Kohlenstoffrings des Trisporoidmoleküls entscheidend. Im (+) Kreuzungstyp von *Blakeslea trispora* konnte ebenfalls die Hydroxylgruppe am C(4) den Carotinaufbau induzieren. Desweiteren war für die erhöhte Carotin-Biosynthese in *Mucor mucedo* eine Keto- oder Hydroxylgruppe am C(13) der Seitenkette bzw. in *Blakeslea trispora* eine Hydroxylgruppe wichtig (Abb.60 A). An den aktiven Trisporoid-Verbindungen wurden Strukturmerkmale deutlich, die der Erkennung durch Regulatorproteine dienen können, deren Untersuchung in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht vorgesehen war. In dieser Arbeit wurde nach Stimulation mit verschiedenen Trisporoidanaloge ergänzend die morphologische Sexualreaktion der Zygothorenbildung bei *Mucor mucedo* beobachtet und mit der Carotinproduktion verglichen. Einige Unterschiede in der Wirksamkeit von Trisporoidanaloge gegenüber Zygothoren- und Carotinproduktion ließen sich erkennen. Der Unterschied zwischen der frühen und daher globalen Reaktion der Carotin-Biosynthese und der spezifischen, morphologischen Reaktion wurde dadurch deutlich. Das Ergebnis kann auf eine unterschiedliche Regulation der beiden Prozesse hindeuten. Das Gen *hmgR* codiert für die Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Reduktase, die einen initiierenden Schritt des Mevalonatweges zur  $\beta$ -Carotinsynthese katalysiert (Abb.6). Das Gen *tsp1* codiert für die 4-Dihydromethyltrisporat-Dehydrogenase, im Trisporinsäure-Biosyntheseweg (Abb.6). Die Gene *hmgR* und *tsp1* von *Blakeslea trispora* wurden nicht durch Trisporinsäure B (**14**) auf Transkriptionsebene reguliert. Eine post-transkriptionelle Regulation ist nicht ausgeschlossen. Das Gen *carB* codiert für die Phytoen-Dehydrogenase, die im Mevalonatweg die Umwandlung von Phytoen zu Lycopin katalysiert. Das Gen *tsp3* codiert für eine  $\beta$ -Carotin spaltende Carotin-Oxygenase. Die Transkription der Gene *carB* und *tsp3* in *Blakeslea trispora* wurde durch Trisporinsäure B (**14**) signifikant stimuliert. Die Carotin-Oxygenase kann daher als frühes, transkriptionell reguliertes Enzym innerhalb des Trisporinsäure-Biosyntheseweges beschrieben werden. Mit dieser Arbeit wurde der erste konkrete Hinweis gegeben, dass Trisporinsäure B (**14**) als regulatorischer Faktor auf transkriptioneller Ebene wirkt. Die Phytoen-Dehydrogenase- und die Carotin-Oxygenase-Reaktion könnten Stellen der positiven Rückkopplungs-Regulation zwischen Trisporinsäure- und Carotin-Biosynthese darstellen.

## Einleitung

---

Der Carotinaufbau, reguliert durch das *carB*-Genprodukt (Phytoen-Dehydrogenase) und der Carotinabbau, reguliert durch das *tsp3*-Genprodukt (Carotin-Oxygenase) werden gleichzeitig transkriptionell reguliert. Die Phytoen-Dehydrogenase könnte dabei für ausreichend  $\beta$ -Carotin-Nachschub sorgen. Die Carotin-Oxygenase könnte daraufhin  $\beta$ -Carotin verstärkt zur Trisporsäure-Biosynthese abbauen. Hierbei ist zu beachten, dass die Funktion der Enzyme nicht in dieser Arbeit untersucht werden sollte. Posttranskriptionelle Regulationen und biochemische Enzymeigenschaften, wie Umsetzungsraten blieben somit bei der Interpretation unberücksichtigt. Aufgrund der transkriptionellen Regulierbarkeit von *tsp3* wurden analog zur Carotinproduktion Struktur-Wirkungs-Beziehungen hinsichtlich des Carotinabbaus aufgestellt. In *Blakeslea trispora* ermöglichte die Hydroxylgruppe am C(13) und die Ketogruppe am C(4) eine verstärkte *tsp3*-Transkription, als Merkmal des Carotinabbaus. In *Blakeslea trispora* (-) wurde zusätzlich die funktionelle Gruppe am C(1) für den Carotinabbau bedeutsam. Das gemeinsame, aktivierende Strukturelement aller Pilzstämme war die Ketogruppe am C(4), die nur in *Blakeslea trispora* (+) auch gegen eine Hydroxylgruppe ausgetauscht werden konnte. Die funktionelle Gruppe am C(1) und C(13) war für die spezifische Reaktion entscheidend. Der Carotinauf- und -abbau werden durch spezifische Trisporoide reguliert, die das Trisporoid-Grundgerüst (Abb.A) aufweisen und in unterschiedlichen Arten und Kreuzungstypen unterschiedliche funktionelle Gruppen am C(1), C(4) und C(13) als Erkennungsmerkmale tragen.

### Summary:

Ubiquitously occurring heterothallic zygomycete such as *Mucor mucedo* (LINNÉ) and *Blakeslea trispora* (THAXTER) have asexual and sexual life cycles. Pheromones of the zygomycetes, so-called trisporoids, serve as communication signals during intraspecific sexual interaction between (+) and (-) mating types. The chemical structure of the pheromones consists of a C<sub>6</sub> ring and an isoprene chain on the C(6) (Fig.A).

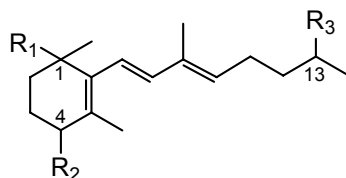


Fig.A: Basic chemical structure of trisporoid molecules, which are used as pheromones during sexual interaction between mating types of a zygomycete species

After being diffused through substrates or air pheromones induce sexual reactions in the complementary mating partner. The effect of pheromones occurs after diffusion through

substrates or air. Trisporin A (**2**) and B (**3**) induced zygothore formation by air diffusion. Volatile compounds from *Mucor mucedo* mating cultures induced the morphological sexual reaction, the so-called zygothore formation. These bioactive compounds are referred to as volatile pheromones. Coupled gas chromatography / mass spectrometry (GC/MS) indicated that some trisporoid compounds such as the keto trisporoid ( $R_1=H$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=O$ ) (**11**) act by air diffusion. In this work the morphological, metabolic and genetic characteristics of zygomycetes are used to summarise the effects of synthetic and isolated trisporoids. The investigation of different levels gives an overall picture of the development of the structural activity principal of trisporoids.

Two-dimensional Raman spectroscopy was used to visualise the distribution of  $\beta$ -carotene in living fungal hyphae. Carotene was distributed over the asexual and sexual structures. Carotene production was induced by synthetic trisporoids to determine the relationships between chemical structure and function in mycelia cultures of *Mucor mucedo* (Mucorales, Mucoraceae) and *Blakeslea trispora* (Mucorales, Choanaeophoraceae). The results of the carotene bioassay point out specific effects of the trisporoid signal molecules in mating types and species. To induce carotene production in *Mucor mucedo* and *Blakeslea trispora*, the keto function on C(4) of trisporoid molecule was necessary. In *Blakeslea trispora* (+) the hydroxyl function induced carotene production. The keto or hydroxyl function on C(13) was essential for carotene induction in *Mucor mucedo*. These structural elements might serve as recognition sites for regulatory proteins. Differences between the specific morphological and early global reactions become apparent when zygothore formation and carotene production are compared. Both processes seem to have different regulatory mechanisms.

The gene *hmgR* codes for the HMG CoA reductase, which catalyses the initial step of the mevalonate pathway for  $\beta$ -carotene biosynthesis. The gene *tsp1* codes for the 4-DHMT dehydrogenase in the trisporic acid pathway. The genes *hmgR* and *tsp1* of *Blakeslea trispora* are not transcriptionally regulated by trisporic acid B (**14**). A post-transcriptional regulation can not be excluded. The gene *carB* codes for the phytoene dehydrogenase in the mevalonate pathway and catalyses the reaction of phytoene to lycopene. The gene *tsp3* codes for the carotene cleavage enzyme, carotene oxygenase. The transcription of the genes *carB* and *tsp3* in *Blakeslea trispora* is significantly induced by trisporic acid (**14**). The carotene oxygenase can be described as an early and transcriptionally regulated enzyme of the trisporic acid pathway. This work gives the first

concrete evidence that trisporic acid B (**14**) is a strong regulatory factor on the transcriptional level. The phytoene dehydrogenase and carotene oxygenase reaction seem to play a role in regulating the feedback between trisporic acid and  $\beta$ -carotene. Carotene production, regulated by the *carB* gene product (phytoene dehydrogenase), and carotene cleavage, regulated by the *tsp3* gene product (carotene oxygenase), are simultaneously transcriptionally regulated. The phytoene dehydrogenase seems to arrange for sufficient carotene supply. The carotene oxygenase might then cleave this carotene to higher amounts of trisporic acid. Neither enzyme characteristics nor post-transcriptional regulation was investigated, so neither is considered in the interpretation. The transcriptional regulation of *tsp3* by trisporoids helped establish the relationships between the molecular structure and function. In *Blakeslea trispora* the hydroxyl function on C(13) and the keto function on C(4) allow for the enhanced transcription of *tsp3*, which is characteristic of carotene cleavage. In *Blakeslea trispora* (-) the functional group on C(1) becomes important.

The common activating structural element of all fungal strains was the keto function on C(4) which could change to hydroxyl function in *Blakeslea trispora* (+). The functional group on C(1) and C(13) was important for specific reactions in species and mating types. Carotene production and cleavage were regulated by specific trisporoids; the basic structure of trisporic acid (Fig.A) and different functional groups on C(1), C(4) and C(13) were important recognition features.

## 2. Einleitung

Die Chemische Ökologie beschäftigt sich mit der Struktur, Herkunft und Funktion natürlich vorkommender Verbindungen, die der intraspezifischen und interspezifischen Interaktion dienen. Instrumentelle Analytik, biologische Beobachtung und Biotest-Entwicklung kennzeichnen das Forschungsgebiet, das sich auf alle Organismengruppen bezieht. Prokaryonten und Eukaryonten kommunizieren innerhalb einer Art und zwischen Arten über chemische Signale miteinander. Diese chemischen Verbindungen, die zwischen Organismen wirken, werden als Semiochemikalien bezeichnet (siehe Abb.1).

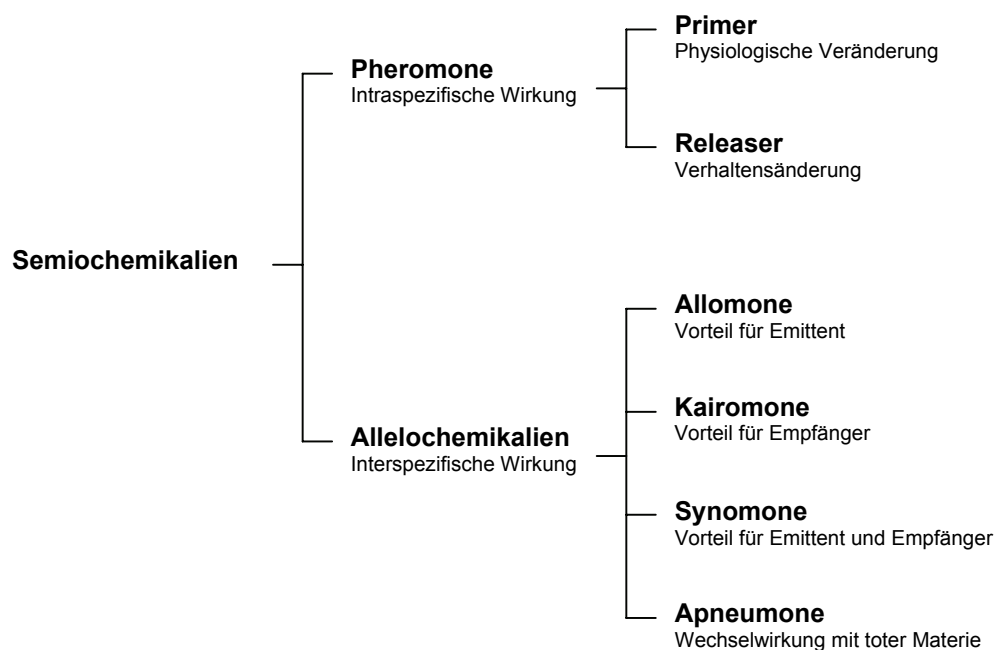


Abb.1: Nomenklatur der Semiochemikalien nach Nordlund (1981).

Verbindungen, die zwischen verschiedenen Arten wirken, werden als Allelochemikalien bezeichnet. Diese interspezifisch wirksamen Verbindungen werden in Allomone, Kairomone, Synomone und Apneumone unterteilt. Apneumone gehen von toter Materie aus und werden von Lebewesen, die einen Nutzen daraus ziehen, erkannt. Allomone sind für den Produzenten von Vorteil und Kairomone bringen der Empfängerart einen Vorteil, während Synomone zum Vorteil von Produzent und Empfänger eingesetzt werden.

Semiochemikalien (Allomone, Kaiomone, Synomone, Pheromone) werden auch von Pilzen produziert, um mit Organismen ihrer Umwelt zu kommunizieren. Die Produktion flüchtiger Verbindungen durch verschiedene Pilze, hauptsächlich durch *Aspergillus*-, *Penicillium*- und *Fusarium*-Arten, ist bekannt (Fiedler *et al.* (2001)). Die flüchtigen Verbindungen können z.B. als Indikatoren dienen, um eine Pilzkontamination z.B. in Lebensmitteln oder Futtermitteln nachzuweisen (Schnürer *et al.* (1999)). Die vorwiegend auftretenden, flüchtigen Verbindungen verschiedener Schimmelpilze sind 2-Methyl-1-propanol, 3-Methyl-1-butanol, Okt-1-en-3-ol, Oktan-3-on, 3-Methylfuran, Ethylacetat, 2-Methylisoborneol und Geosmin. Flüchtige Sesquiterpene aus *Penicillium*-Arten können sogar verwendet werden, um taxonomische Klassifikationen und Artidentifikationen durchzuführen. *Mucor sp.* produziert nach Fiedler *et al.* (2001) z.B. Dekan, 2-Methyl-1-butanol, 3-Methyl-1-butanol, Toluol und Xylol. Fruchtkörper von *Fomitopsis pinicola* (Polyporaceae) produzieren (*R*)- und (*S*)-Okt-1-en-3-ol und Oktan-3-on während der Sporulation und auch *Fomes fomentarius* (Polyporaceae) produziert in erhöhtem Maße Oktan-3-on (Fäldt *et al.* (1999)). Der typische Pilzgeruch entsteht durch flüchtige C<sub>8</sub>-Verbindungen, wie *rac*-Okt-1-en-3-ol, *rac*-Oktan-3-ol, Oktan-1-ol und Oktan-3-on (siehe Abb.2). Das (*R*)-(-)-Okt-1-en-3-ol ist für einen starken Pilzduft verantwortlich und das (*S*)-(+)-Okt-1-en-3-ol für einen schimmlichen, grasartigen Geruch (Mosandl *et al.* (1986)). Oktenol wurde in *Blakeslea trispora* von Nabeta *et al.* (1980), in *Aspergillus* bei Schnürer *et al.* (1999) und in *Fomes fomentarius* bzw. *Fomitopsis pinicola* von Fäldt *et al.* (1999) gefunden, jedoch nicht in *Mucor sp.* (Fiedler *et al.* (2001)).

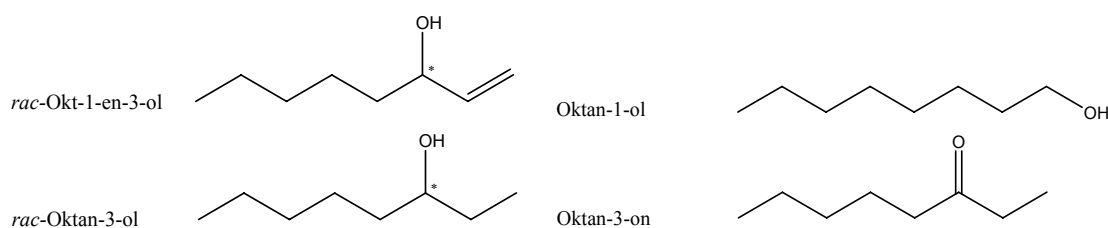


Abb.2: Auswahl flüchtiger C<sub>8</sub>-Verbindungen, die den typischen Pilzgeruch ergeben.

Die flüchtigen C<sub>8</sub>-Verbindungen sind als Insekten-Lockstoffe bekannt. Untersuchungen wiesen auf eine Anziehung von Käfern durch Gerüche von Pilzfruchtkörpern hin (Fäldt *et al.* (1999)). Weibliche Tiere der Waldkäfer *Malthodes fuscus*, *Anaspis marginicollis* und *Anaspis rufilabris* und beide Geschlechter der Motte *Epinotia tedella* werden durch *rac*-Okt-1-en-3-ol angelockt. Der Käfer *Lordithon lunulatus* wird durch eine Kombination aus *rac*-Okt-1-en-3-ol und Oktan-3-on angezogen. Der Getreidekäfer *Oryzaephilus mercator*

reagiert gleichermaßen auf (*R*)-(-)-, (*S*)-(+)- und *rac*-Okt-1-en-3-ol in einem Testbereich von 0,1 ng bis 10 µg (Pierce *et al.* (1989)).

Einige Arthropoden sind dafür bekannt, dass sie Pilze, die mit feuchtem Getreide assoziiert sind, fressen und sich dort fortpflanzen (Sinha (1968)). Pierce *et al.* (1991) fand heraus, dass 3-Methylbutanol, Okt-1-en-3-on, *rac*-Oktan-3-ol und Oktan-3-on unterschiedlich attraktiv für verschiedene Käferarten, wie *Cryptolestes ferrugineus*, *Oryzaephilus surinamensis* oder *Ahasverus advena*, sind.

Die Wechselwirkungen zwischen Pilzen und Insekten sind Beispiele für die Verwendung von Allelochemikalien. Entweder dienen die Signalstoffe dem Empfänger, z.B. wenn er auf Nahrungssuche ist (Kairomone) oder dem Produzenten, wenn er ein lebendes Transportmittel für seine Sporen benötigt (Allomone).

### **2.1. Pilzliche Pheromone dienen der intraspezifischen, sexuellen Kommunikation**

Verbindungen, die innerhalb einer Art wirken, werden als Pheromone bezeichnet. Pheromone werden von einem Senderorganismus produziert und diffundieren durch das Substrat oder die Luft zum Empfängerorganismus. Pheromone werden nach ihrer Wirkung z.B. in Sexual-, Aggregations- oder Alarmpheromone eingeteilt. Die Einteilung in Releaser-Pheromone verdeutlicht die Wirkung der Signalmoleküle auf das Verhalten des Lebewesens und Primer-Pheromone lösen physiologische Veränderungen im Empfängerorganismus aus. Primer-Pheromone bewirken z.B. physiologische Veränderungen während des sexuellen Lebenszyklus im Sexualpartner. Organismen locken einen Sexualpartner, teils auch über große Entfernungen, an. Ein gasförmiger Charakter der Pheromonmoleküle ist für eine schnelle Diffusion sinnvoll.

Die sexuelle Fortpflanzung von Pilzen verschiedener Klassen wird durch Pheromone gesteuert (Gooday (1994)). Filamentöse Pilze wie *Achlya spp.* produzieren die Sterole Antheridiol und Oogoniol. *Allomyces spp.* bildet das Sesquiterpen Sirenin. *Aspergillus nidulans* nutzt den Psi Faktor C und *Gibberella zeae* verwendet Zearalenon zur Verständigung mit dem Sexualpartner (siehe Abb.3).

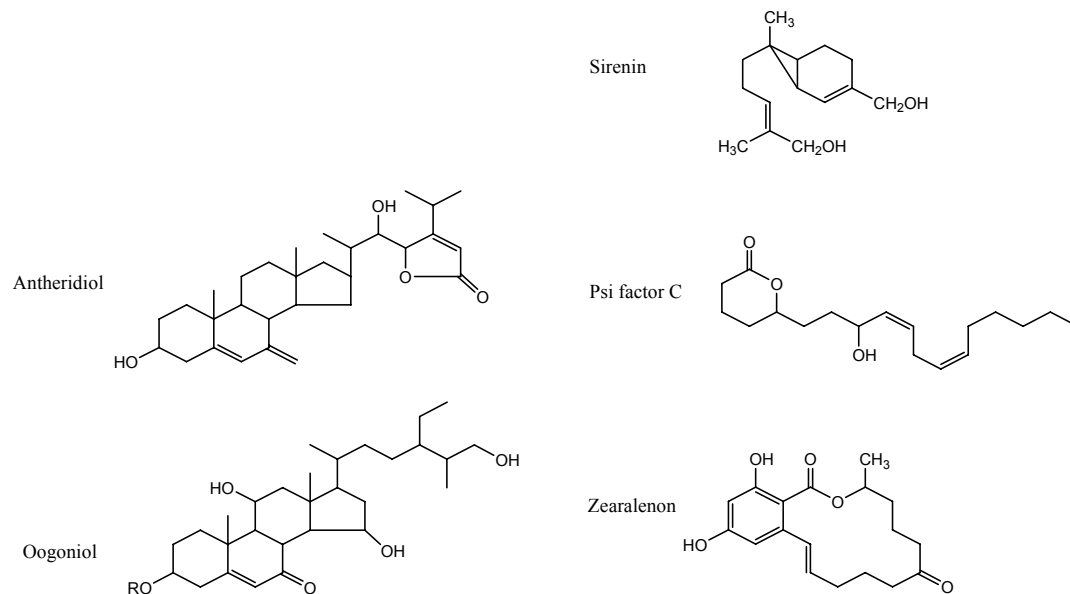


Abb.3: Chemische Strukturformeln ausgewählter Pilz-Pheromone.

Der Ascomycet *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) nutzt Peptidpheromone zur Verständigung mit dem Kreuzungspartner. Der  $\alpha$ -Kreuzungstyp produziert den  $\alpha$ -Faktor, bestehend aus 13 Aminosäuren. Der  $\alpha$ -Kreuzungstyp bildet den  $\alpha$ -Faktor, bestehend aus einem C<sub>15</sub>-Terpenoid mit 12 Aminosäuren. Die Pheromonproduktion in *S. cerevisiae* ist transkriptionell durch Produkte des *MAT*-Genlocus reguliert (siehe Abb.4). Der *MAT* $\alpha$  Genlocus codiert für zwei regulative Proteine. Zum einen wird die Gentranskription  $\alpha$ -spezifischer Gene, die für den  $\alpha$ -Faktor-Rezeptor oder das  $\alpha$ -Faktor-Pheromon kodieren, stimuliert. Zum anderen wird die Transkription  $\alpha$ -spezifischer Gene unterdrückt. Im Vergleich zu diploiden Zellen, die nach dem Kreuzungsprozess entstehen, wird in haploiden  $\alpha$ - und  $\alpha$ -Zellen die Meiose durch Expression haploid-spezifischer Gene verhindert. In  $\alpha$ -Zellen werden die  $\alpha$ -spezifischen Gene für  $\alpha$ -Faktor-Rezeptor und  $\alpha$ -Faktor-Pheromon exprimiert und die Expression der  $\alpha$ -spezifischen Gene nicht stimuliert. In diploiden Zellen wird durch die *MAT* $\alpha$ - und *MAT* $\alpha$ -Genprodukte die Pheromon- und Rezeptorproduktion sowie die Expression haploid-spezifischer Gene unterdrückt, damit die Meiose stattfinden und die Sporenbildung beginnen kann. (Herskowitz (1988), Herskowitz (1989), Casselton (2002))



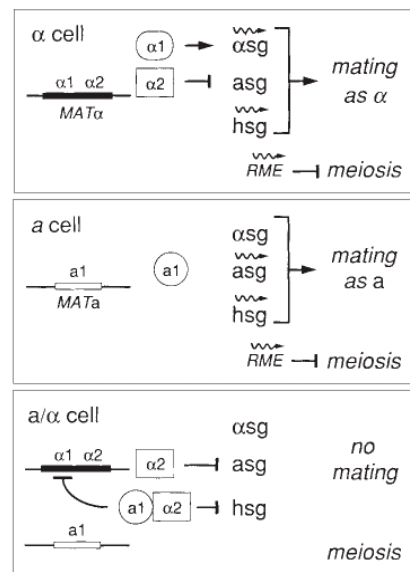


Abb.4: Transkriptionskontrolle der Rezeptor- und Pheromonproduktion durch MAT-Genlocus-codierte Genprodukte in haploiden α- und a-Zellen von *S. cerevisiae* und Transkriptionskontrolle der Meiose in diploiden a/α-Zellen. In α-Zellen bewirkt die Transkription von α1 eine Stimulation der αsg und α2 eine Hemmung der asg und somit die Bildung des a-Faktor-Rezeptors und des α-Faktor-Pheromons. In a-Zellen verursacht die Transkription von a1 keine Hemmung der asg und somit die Produktion des α-Faktor-Rezeptors und des a-Faktor-Pheromons. In diploiden Zellen verhindert α2 die Expression von asg. Die Transkription von a1 und α2 verhindert die Expression von αsg und hsg wodurch die Meiose eingeleitet wird.

asg = a-spezifische Gene kodieren für a-Faktor und α-Faktor-Rezeptor (*STE2*, *STE6*, *MFA1*, *MFA2*, *BAR1*), αsg = α-spezifische Gene kodieren für α-Faktor und a-Faktor-Rezeptor (*STE3*, *MFa1*, *MFa2*), hsg = haploid-spezifische Gene verhindern Meiose (*STE4*, *STE12*, *STE18*, *MATa1*, *MATa2*, *KAR1*, *SCG1*, *Ty1*, *RME1*)

Bei *S. cerevisiae* werden Pheromone des komplementären Partners an sieben-Transmembran-Domänen-Rezeptoren (Ste2 bzw. Ste3) aufgenommen. Anschließend erfolgt eine Signalweiterleitung über G-Proteine (Gpa1) und die Mitogen-aktivierte Proteinkinasekaskade. Die Zellen werden daraufhin durch transkriptionelle Regulationsvorgänge zur Verschmelzung befähigt (Versele *et al.* (2001), Herskowitz (1989)). Die Abbildung 5 zeigt den Vergleich zwischen Glukose- und Pheromon-Erkennung in *S. cerevisiae*. Beide Signalwege beinhalten G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren. Der Glukose-Signalweg läuft jedoch nicht über MAP-Kinasen, sondern ist cAMP-vermittelt und resultiert in verstärktem Zellwachstum, Stressresistenz oder Kohlenhydratspeicherung. In *Schizosaccharomyces pombe*, *Cryptococcus neoformans* und *Candida albicans* sind ebenfalls G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und MAP-Kinasekaskaden während der Pheromonerkennung beteiligt (Bahn, Y.S. *et al.* (2007)). G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kaskaden sind weit verbreitete, konservierte Vorgänge in Pilzen.

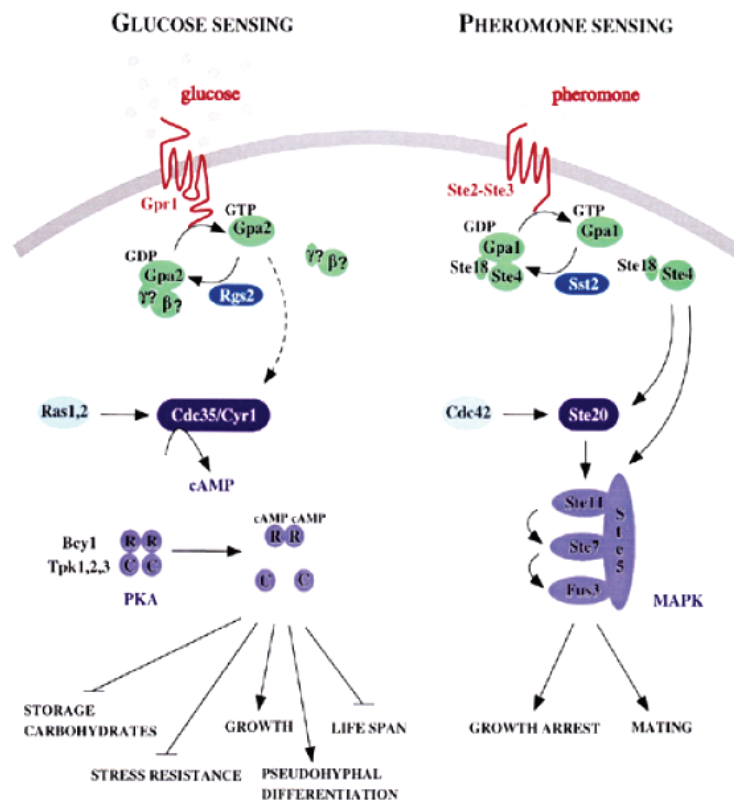


Abb.5: G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Signaltransduktionskaskaden während der Glukose- und Pheromon-Erkennung in *S. cerevisiae* (Versele et al. (2001)). Beide Signalwege finden über eine G-Protein-gekoppelte Signalweiterleitung von 7-Transmembran-Rezeptoren statt. Die Glukose-Erkennung wird durch eine cAMP/PKA-vermittelte Kaskade und die Pheromon-Erkennung über eine MAP-Kinase-Kaskade zum Effekt umgesetzt.

## 2.2. Allgemeine Regulationsprinzipien der zellulären Kommunikation und spezifische Regulationsprinzipien der Genexpression

Pheromone beeinflussen die Genexpression in verschiedenen Organismen. Die Genexpression wird im Allgemeinen in Zellen als Antwort auf Außensignale verändert (Lucas & Granner (1992)). Die Regulation der Genexpression wird durch das Erkennen der spezifischen DNA-Sequenzen von Gen-Regulatorproteinen mit Hilfe ihrer DNA-Bindungsmotive ermöglicht (Seeman *et al.* (1976)). Die Kombination aus den beiden Komponenten Gen-Regulatorprotein und spezifische DNA-Sequenz wird als genetischer Schalter bezeichnet. Die genetischen Schalter werden benutzt, um Gene als Antwort auf Signale ein- und auszuschalten. Meist wird die DNA von Regulatorprotein-Dimeren erkannt (Helix-Turn-Helix-Motiv, Zinkfinger-Proteine, Leucin-Zipper-Motiv) (Jacob & Monod (1961)).

Die meisten Regulationsprinzipien betreffen die Transkriptionskontrolle. Die Transkriptionskontrolle in Eukaryonten ist komplex. Eukaryonten benötigen die Assoziation von Transkriptionsfaktoren am Promotor, den so genannten Allgemeinen Transkriptionsfaktoren, bevor die RNA-Polymerase aktiv wird (Zawel & Reinberg (1993)). Während des Assoziationsprozesses kann zu mehreren Aktivitätsphasen positiv oder negativ reguliert werden. Ein einzelner Promotor kann von vielen regulatorischen Sequenzen, auch weit entfernt von der Promotorregion, kontrolliert werden. Gen-Regulatorproteine können z.B. an Verstärkerregionen auf der DNA binden, die eine Transkriptionsverstärkung auf Distanz bewirken. Gen-Aktivatorproteine beschleunigen die Ansammlung der Allgemeinen Transkriptionsfaktoren. Gen-Repressorproteine können z.B. mit Aktivatorproteinen konkurrieren und die Genexpression hemmen. Eukaryontische Regulatorproteine wirken oft durch Zusammenlagerung zu Komplexen auf der DNA (Johnson & McKnight (1989)). Gen-Regulatorproteine können auf unterschiedliche Weise aktiviert werden. Die Aktivierung erfolgt z.B. durch Phosphorylierung, Ligandenbindung, Abspaltung eines inhibitorischen Proteins durch Phosphorylierung oder Kerneintritt, Hybridisierung mit einer DNA-bindenden Untereinheit oder gezielte Synthese und schnellen Abbau (Hunter & Karin (1992)).

Um in einer Zelle eine Reaktion auf ein Signal zu erhalten, bedarf es der Signalerkennung und zellulären Signalübertragung. Die spezifische Antwort wird, wie im Abschnitt zuvor beschrieben, durch die Änderung der Gentranskription gesteuert.

Steroidhormone, Thyreoidhormone, Retinoide und Vitamin D haben unterschiedliche, chemische Strukturen, aber ähnliche Wirkungsweisen bei der Signalübertragung in Zellen. Die kleinen, hydrophoben Signalmoleküle diffundieren durch Plasmamembranen und binden an intrazelluläre Rezeptoren. Das Rezeptorprotein wird aktiviert und daraufhin die Genexpression kontrolliert (Yamamoto (1985)). Intrazelluläre Kernrezeptoren sind Liganden-induzierte Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Zielgenen spezifisch regulieren. Die Hauptaufgabe der Rezeptoren besteht in der Vermittlung der transkriptionellen Antwort auf Hormone, wie z.B. Retinoidhormone (McKenna & O'Malley 2001). Mit dem Rezeptor assoziierte Coregulatoren können während der Vermittlung genutzt werden (McKenna & O'Malley 2001).

Vitamin A-Derivate, wie die Retinsäure wirken als lokale Vermittler bei Entwicklungsspezifischen Prozessen in Wirbeltieren. Die relativ wasserunlöslichen Signalmoleküle werden in Wirbeltieren durch Bindung an Transportproteine in Flüssigkeiten bewegt und

höher affine Rezeptoren übernehmen den Liganden in der Zielregion. Retinsäure-Rezeptoren befinden sich vorwiegend im Zellkern. Die aktivierten Rezeptoren binden an spezifische DNA-Sequenzen in der Nähe des hormonregulierten Gens. Die Ligandenbindung führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins, das die Gentranskription in den meisten Fällen aktiviert. Nach spätestens 30 min findet eine spezifische Transkriptionsänderung als Primärantwort statt. Anschließend kann die Sekundärantwort folgen, bei der die zuvor entstandenen Genprodukte weitere Gene beeinflussen. Ein hormonelles Signalmolekül kann somit weit reichende Veränderungen im Genexpressionsmuster bewirken (Evans (1988)).

Nach der Erkennung und dem Transport eines Signals, wie z.B. Retinsäure oder Trisporsäure, wird die Genexpression in der Zelle beeinflusst und eine metabolische oder/und morphologische Veränderung herbeigeführt. Trisporsäure verursacht eine erhöhte Carotinproduktion und Zygophorenbildung im Myzel von *M. mucedo* (Gooday 1978). Dennoch gibt es bisher keine Beweise, dass ein Trisporsäure-Rezeptor bei Zygomyceten existiert. Die genaue Wirkungsweise von Trisporsäure ist noch ungeklärt.

### **2.3. Trisporsäure-Vorstufen dienen Zygomyceten als Pheromone zur sexuellen Kommunikation**

Die heterothallischen Vertreter der Zygomyceten (Jochpilze), zu denen auch *Blakeslea trispora* und *Mucor mucedo* gehören, erkennen ihren Kreuzungspartner über den Chemotropismus. In beiden Kreuzungstypen einer Art ist eine Pheromonproduktion nachweisbar. Als Pheromone dienen terpenoide Verbindungen, so genannte Trisporoide. Trisporoide werden zwischen den Kreuzungstypen der heterothallischen Zygomyceten einer Art ausgetauscht und dadurch die initiiierenden, sexuellen Fortpflanzungsprozesse eingeleitet (Gooday (1994)).

Burgeff (1924) zeigte erstmals, dass Pheromone für die Erkennung der Kreuzungspartner von *M. mucedo* verantwortlich sind. Sexuell determinierte Lufthyphen, sogenannte Zygophoren, werden ohne direkten Kontakt zwischen den Hyphen gebildet. Zygophoren erheben sich als gerade, unverzweigte Lufthyphen vom Substratmyzel. Plempel (1957) benannte die bioaktiven Verbindungen als (+) und (-) Gamone. Die Gamone wurden aus *M. mucedo* Kreuzkulturen in Agar- und Flüssigkulturen gewonnen und induzierten Zygophorenbildung in beiden Kreuzungstypen von *M. mucedo*. Gamone, gewonnen aus Flüssigkulturen, blieben im Kühlschrank wochenlang haltbar.

## Einleitung

---

Die (-) Zygophoren aus Kreuzkulturen entsprechen in ihrer Dicke asexuellen Sporangienträgern und sind länger als (+) Zygophoren. Sie können schwache Verzweigungen aufweisen und eine verdickte Spitze. Nach Stimulation mit isoliertem Gamon entwickelten sich beim (-) Kreuzungstyp innerhalb von 8 h und beim (+) Kreuzungstyp innerhalb von 15 h Zygophoren.

Die Entwicklungsstudie von *M. mucedo* in der vorliegenden Arbeit (siehe Abb.10) zeigte, dass Zygophoren in beiden Kreuzungstypen von *M. mucedo* nach ca. 10 h nach Berührung mit dem komplementären Kreuzungspartner gut sichtbar waren. Die Zygophoren von *M. mucedo* (-) sind etwa 250-400 µm lang und Zygophoren von *M. mucedo* (+) erreichen ca. 1 mm (Schimek *et al.* (2003)). Der Durchmesser beträgt bei beiden Kreuzungstypen 15-20 µm. Erst nach ca. 70 h nach Berührung entstehen erste Zygosporien.

Gooday (1968) beobachtete, dass *M. mucedo* (-) Stämme stärker und schneller mit Zygophorenbildung auf Applikation von Trisporoid-haltigem Pilzextrakt antworteten als (+) Stämme. Aber in Kreuzkulturen produzierte der (+) Stamm mehr und früher Zygophoren als der (-) Stamm. Eine Erklärung war, dass der (+) Stamm das wirksame Pheromon bildete, wenn er durch den (-) Stamm stimuliert wurde und der (-) Stamm durch die sich ergebende Diffusionszeit des im (+) Typ synthetisierten Pheromons bzw. Hormons später reagierte.

Banbury (1954) bzw. Plempel & Dawid (1961) machten Biotests zum Nachweis flüchtiger Wirkstoffe und schlussfolgerten, dass Pheromone bei Zygomyceten existieren und flüchtig sein müssen. Pheromone vom (+) Kreuzungstyp bewirkten über den Luftweg im (-) Kreuzungstyp eine Zygophorenbildung bzw. umgekehrt. Plempel & Dawid (1961) zeigten, dass die Zygophoren des (-) Kreuzungstyps von Pheromon-induzierten *M. mucedo* Myzelien nur an der Stelle stärker wuchsen, an der eine Luftverbindung zum (+) Kreuzungstyp durch ein Loch in der Trennmembran zwischen den Myzelien vorlag. Eine Substratverbindung wurde ausgeschlossen. Die zygotropische Reaktion wurde demnach durch Substanzen in der Gasphase gesteuert. Plempel (1962) beobachtete ebenfalls in Biotests, dass die zygotropischen Wirkstoffe entlang eines Konzentrationsgefälles wirkten. Die Substanzen waren sauerstoffempfindlich. Ob ebenfalls gasförmige Verbindungen für die Induktion der Zygophorenbildung benutzt wurden, war ungeklärt.

Einen biologischen Beweis für die Induktion der Zygophorenbildung durch gasförmige Verbindungen erbrachten Mesland *et al.* (1974). Zwei getrennte Agarmedien wurden mit

unterschiedlichen Kreuzungstypen von *M. mucedo* in einer Petrischale beimpft. Eine Substratverbindung wurde ausgeschlossen. Beide Myzelien bildeten Zygophoren aus. Die Bildung der Zygophoren musste also durch gasförmige Wirkstoffe ausgelöst werden. Die Autoren vermuteten außerdem, dass die Zygophoreninduktion und der Zygotropismus möglicherweise auf demselben Mechanismus basieren. Zygophoren sollten in der Lage sein, Trisporsäure-Vorstufen, die eine Zygophorenbildung auslösen, zu produzieren, denn Werkman (1976) lokalisierte ein Enzym (4-DHMT-Dehydrogenase) in Zygophoren von *M. mucedo*, dass die Umsetzung einer Trisporsäure-Vorstufe katalysiert. Nach den Ergebnissen von Mesland *et al.* (1974) könnten die Trisporsäure-Vorstufen, um ihre Wirkung zu entfalten, in die Luft abgegeben werden.

Die terpenoide Struktur der Pheromon-Moleküle wurde durch Untersuchungen an *B. trispora* und *M. mucedo* aufgeklärt. Trisporoide, die Vorstufen des Sexualhormons Trisporsäure, bestehen aus einem Ring mit sechs Kohlenstoffatomen und einer kurzen Isoprenoidkette am C(6) des Rings (siehe Abb.6).

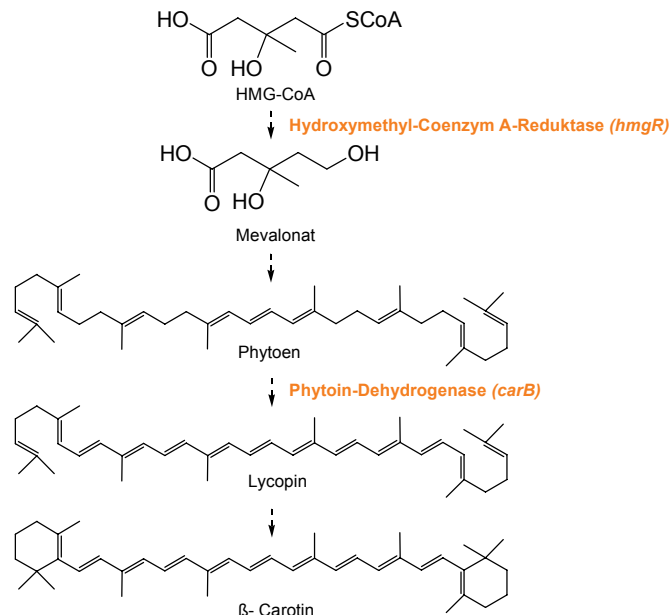
Bei Vertretern der Mucorales (van den Ende (1968); Austin *et al.* (1969); Werkman (1976)) und auch Mortierellales (Schimek *et al.* (2003)) wurde die Synthese von Trisporsäure und ihrer Vorstufen analytisch nachgewiesen. Gooday (1968) isolierte aus Kreuzkulturen von *M. mucedo* erstmals Trisporsäure, die eine Induktion der Zygophorenbildung bewirkte. In *M. mucedo* wurde bisher Trisporsäure B und C (Austin *et al.* (1969)), 4-Dihydromethyltrisporat (4-DHMT), Trisporin (Nieuwenhuis & van den Ende (1975)) und 4-Dihydrotrisporin (4-DHT) (Werkman (1976)) nachgewiesen. In *B. trispora* wurde zusätzlich Methyltrisporat (Sutter & Whitacker (1981)) und Trisporol (Austin *et al.* (1970)) gefunden.

Durch chemische Analytik und Fütterungsexperimente mit *B. trispora* und *M. mucedo* wurde die kooperative Trisporsäure-Biosynthese für Zygomyceten aufgestellt (van den Ende (1968), Sutter (1987)) (siehe Abb.6). Fütterungsexperimente ergaben, dass Einzelkulturen bei Zugabe von <sup>14</sup>C-markierten Extrakten des komplementären Kreuzungspartners markierte Trisporsäure B und C produzierten (Sutter *et al.* (1974)). Die Verbindungen eines komplementären Kreuzungspartners wurden folglich für die Synthese verwendet. Ein ausführliches Schema mit dem Austausch von Vorstufen zwischen den Kreuzungspartnern von *B. trispora* für die Biosynthese von Trisporsäure wird bei Sutter (1987) beschrieben (siehe Abb.6). Die kooperative Biosynthese von Trisporsäure in Kreuzkulturen ist derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt und somit eine Hypothese.

## Einleitung

Mevalonat-

Biosyntheseweg:



Trisporsäure-

Biosyntheseweg:

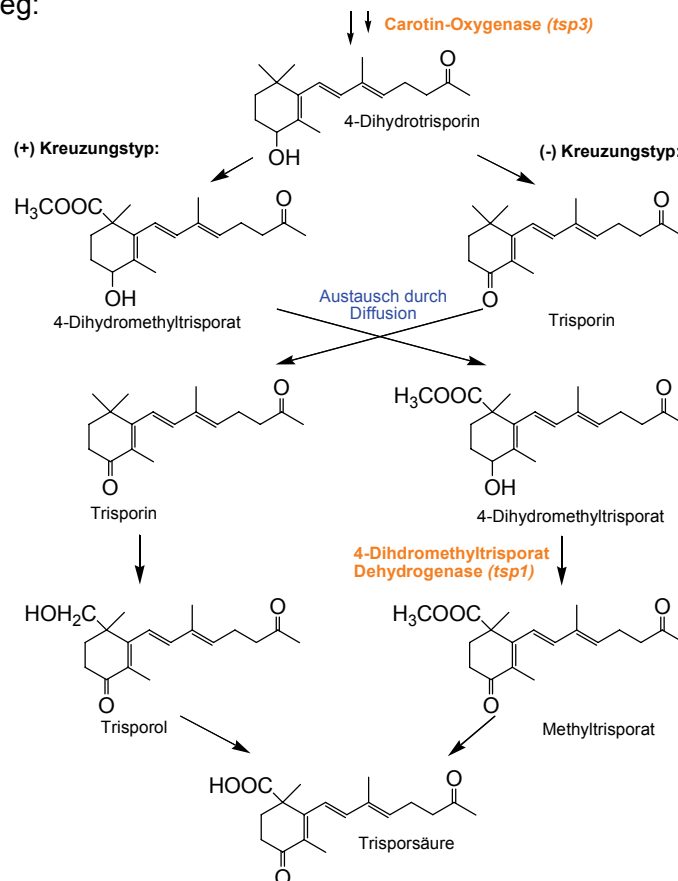


Abb.6: Biosyntheseweg zum  $\beta$ -Carotinaufbau und -abbau in *B. trispora* mit bislang identifizierten Enzymen und zugehörigen Genen. Gezeigt sind der Mevalonat-Biosyntheseweg und ein vereinfachter, postulierter, kooperativer Trisporsäure-Biosyntheseweg von *B. trispora* der B-Derivat-Serie (Modifikation nach Sutter (1987)). Postuliert werden weiterhin eine A-, C-, D- und E-Serie mit Abwandlungen am C(2), C(3) und C(13) der Trisporoidmoleküle.

### **2.4. Die Biosynthese der frühen Trisporsäure-Vorstufe $\beta$ -Carotin wird durch unterschiedliche Faktoren reguliert**

Durch Hemmexperimente, Mutantenanalysen und Fütterungsstudien wurde nachgewiesen, dass  $\beta$ -Carotin die biochemische Vorstufe der Trisporoide im postulierten Trisporsäure-Biosyntheseweg ist. Diphenylamin als Phytoen-Dehydrogenase-Hemmstoff verhinderte nicht nur die Carotin-Biosynthese, sondern gleichzeitig die Trisporsäure-Biosynthese, so dass ein Zusammenhang vermutet werden konnte (Austin *et al.* (1969)). Mutanten von *Phycomyces blakesleeanus* mit Defekten in der Carotinproduktion waren gleichzeitig in ihrer sexuellen Vermehrung gestört (Heisenberg & Cerdá-Olmedo (1968); Sutter (1975)). Außerdem produzierten *B. trispora* Kulturen, die mit [ $^{14}$ C] $\beta$ -Carotin gefüttert wurden, markierte Trisporsäure (Austin (1970)). Als Zwischenprodukte der Umsetzung von  $\beta$ -Carotin zum Sexualhormon Trisporsäure wurden Retinal,  $\beta$ -C<sub>18</sub>-Keton und seine 4-Hydroxyl-Derivate identifiziert (Bu'Lock *et al.* (1974)).

Murillo & Cerda-Olmedo (1976) schlussfolgerten aus Mutantenuntersuchungen an *Phycomyces blakesleeanus*, dass vier Mechanismen die  $\beta$ -Carotin-Anreicherung kontrollieren: Rückkopplungshemmung durch  $\beta$ -Carotin, Stimulation durch Vitamin A und  $\beta$ -Ionon, Stimulation durch Licht und Trisporsäure-vermittelte sexuelle Stimulation. Trisporsäure bewirkt bei *M. mucedo* (Gooday (1968)) und *B. trispora* (Caglioti *et al.* (1966)) eine Induktion der Carotinproduktion. Andere Aktivatoren der  $\beta$ -Carotin-Biosynthese sind  $\beta$ -Ionon, Retinol und Dimethylphthalate. Nach Zugabe von Retinol erhöhten sich die Transkriptlevel der Phytoen-Dehydrogenase in *Phycomyces blakesleeanus* (Ruiz-Hidalgo *et al.* (1997)).

$\beta$ -Carotin, die frühe Vorstufe des Sexualhormons Trisporsäure, wird in Zygomyceten über den Mevalonatweg synthetisiert, der auch für die Synthese von Sterolen (Erosterol) und Ubichinonen genutzt wird (siehe Abb. 7). Carotin, Ubichinon und Triacylglycerole werden vermutlich in separaten, subzellulären Regionen synthetisiert (Kuzina *et al.* (2006)). Im Mevalonatweg wird Mevalonat (MVA) aus Acetyl-Coenzym A synthetisiert. Kinasen phosphorylieren das Mevalonat, das anschließend zu Isopentenylidiphosphat (IPP) decarboxyliert wird. Isopentenylidiphosphat wird durch Isomerisierung und Verlängerung der Kohlenstoffkette zu Phytoen umgewandelt. Die Phytoen-Dehydrogenase katalysiert die Reaktionen von Phytoen zu Lycopin, das durch Zyklisierung schließlich zu  $\beta$ -Carotin umgewandelt wird (Iturriaga *et al.* (2001)).



## Einleitung

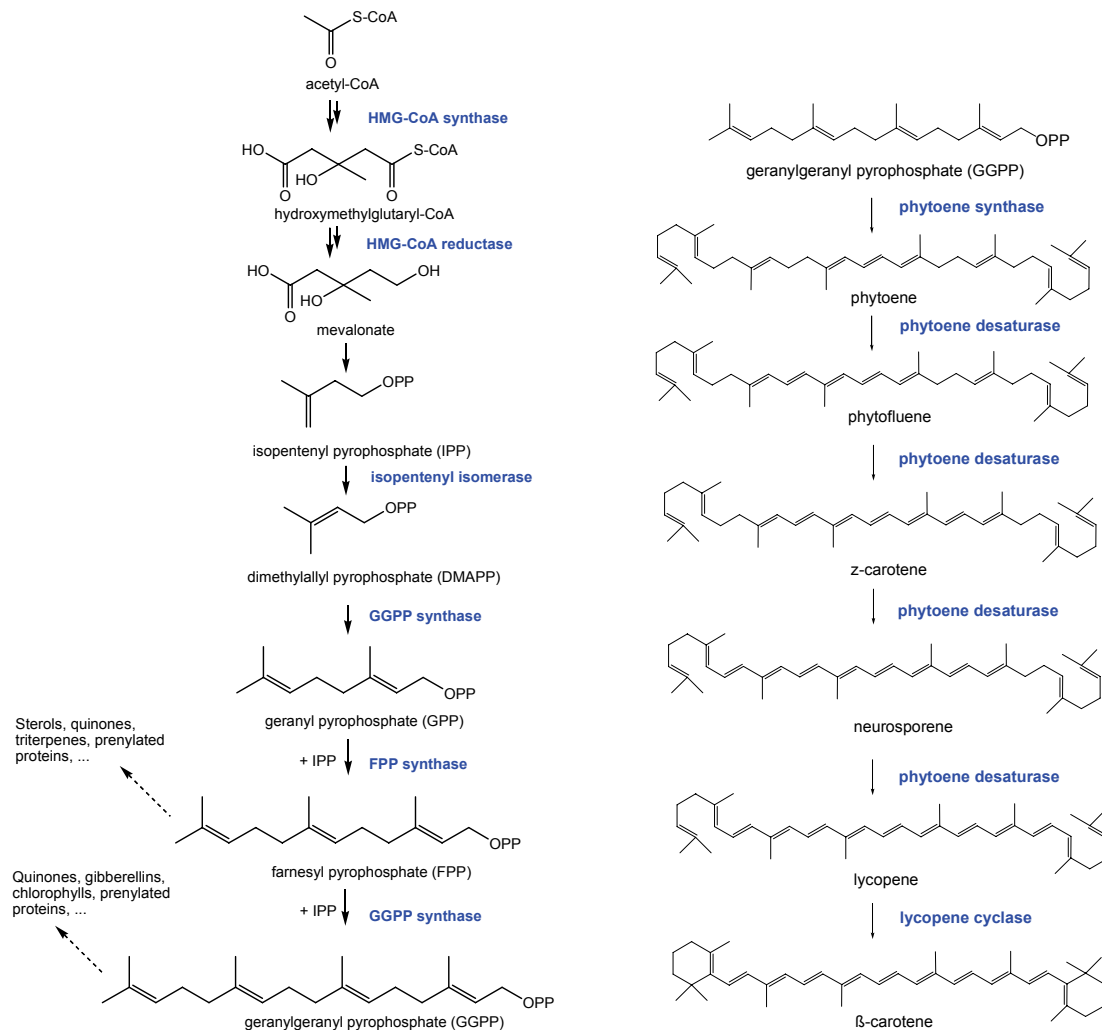


Abb.7: Mevalonatweg zur  $\beta$ -Carotin-Biosynthese in Zygomyceten und Abzweigungsstellen zu weiteren Stoffwechselwegen (Iturriaga *et al.* (2001)). Aus Acetyl-CoA wird über HMG-CoA Mevalonat gebildet. Mevalonat wird zu Isopentenylpyrophosphat und geht in verschiedene Stoffwechselwege, wie die Biosynthese von Sterolen oder Chinonen ein. Über die biosynthetische Zwischenstufe des Geranylgeranylpyrophosphats wird Phytoen und über weitere Zwischenschritte schließlich  $\beta$ -Carotin gebildet.

Neben der Grünalge *Dunaliella* ist *B. trispora* der einzige industriell genutzte Organismus zur  $\beta$ -Carotinproduktion (Sandmann & Misawa (2002)). Der Produktionsprozess wurde mit Kreuzkulturen entwickelt und optimiert. Komplexe Medien mit Stärke und ölreichen Inhaltsstoffen und Zugabe von Kerosin wurden erfolgreich eingesetzt. Aus einem Liter Medium konnten so 1-3 g  $\beta$ -Carotin bzw. 17-30 mg/g Trockengewicht gewonnen werden.

Industriell hergestellte Carotinoide werden als Lebensmittelfarbstoff, als Tierfutterzusatz oder in Medikamenten und Kosmetika eingesetzt (Bauernfeind (1981)). Carotinoide

wirken als Antioxidantien und bieten damit einen Schutz vor oxidativer Zerstörung und anderen Prozessen, bei denen die Schädigung durch freie Radikale ausgelöst wird (Ames et al. (1993)).

### 2.5. Verbreitung und sexueller Lebenszyklus von Zygomyceten

Innerhalb der Klasse der Zygomycetes (Jochpilze) finden sich viele saprophytische Arten, die vollständig zum Landleben übergegangen sind (Zycha (1935)). Die Pilze besiedeln überreife Früchte, alte Lebensmittel oder Tierexkrementen, wie Pferdemist und den Erdboden.

Die Untersuchungsobjekte der vorliegenden Arbeit sind Vertreter der Ordnung Mucorales (siehe Abb.8).

Eumycota (echte Pilze)

(Unter)Klasse: Zygomycetes (Jochpilze),

Ordnung: Mucorales,

Unterordnung: Mucorineae,

Familie: Mucoraceae / Choanephoraceae,

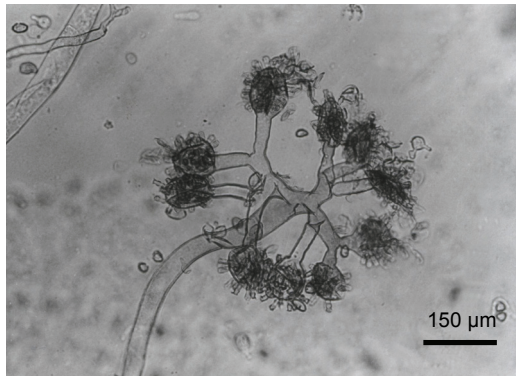
Gattung: Mucor / Blakeslea

Art: *Mucor mucedo* / *Blakeslea trispora*

Abb.8: Systematische Einordnung der eukaryontischen Untersuchungsobjekte dieser Arbeit innerhalb der Gruppe der echten Pilze.

Vertreter der Mucorineae besitzen Hyphen mit mehreren, ca. 2 µm großen Zellkernen. Die jungen Hyphen sind unseptiert. Die Zellwände enthalten Chitin. Eine Septierung der Hyphen erfolgt unter verschiedenen Lebensbedingungen in älterem Substratmyzel, zur Bildung besonderer Organe oder bei Verletzung. Sporangien, die die einzelligen, vegetativen Sporen tragen und der Fortpflanzung dienen, erheben sich über das Substratmyzel. Die Morphologie der Sporangien unterscheidet sich zwischen den Arten (siehe Abb. 9). Die meisten Sporangien tragen mehrere, unbewegliche, einzellige, ein- oder mehrkernige Sporen (Zycha (1935)).

A:



B:

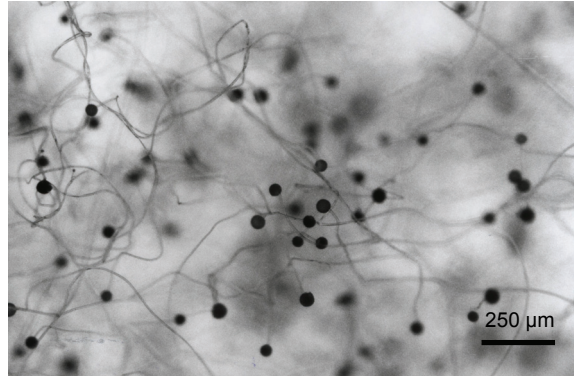


Abb.9: A: Asexueller Sporangienträger von *B. trispora* mit Vesikeln, die mehrere Sporangiolen mit je 3-4 Sporen tragen. B: Meist unverzweigte Sporangienträger von *M. mucedo* tragen je ein kugeliges, asexuelles Sporangium. (Fotos M. Richter)

Zygomyceten zeigen neben einer asexuellen Fortpflanzungsstrategie auch einen sexuellen Lebenszyklus. Dabei treten die drei Hauptmerkmale von Sexualität in Eukaryonten auf: Plasmogamie, Karyogamie und Meiose (van den Ende (1976)).

Während des sexuellen Lebenszyklus entstehen nach Verschmelzung von Hyphen zweier Kreuzungspartner einer heterothallischen Art die jungen Gametangien, die sich zu Zygosporen entwickeln (siehe Abb.10). Der Vorgang wird als Isogametangiogamie bezeichnet. In der reifenden Zygospore verschmelzen mehrere Kernpaare miteinander. Die Entwicklung von sexuellen Zygosporen gab den Pilzen ihren Namen. Verschiedene Arten zeigen in den Zygosporen ein unterschiedliches Verhalten von Zellkernen. Z.B. können nach wenigen Tagen alle Kerne paarweise fusionieren und sich meiotisch teilen, so dass die reife Zygospore nur haploide Kerne enthält. Eine andere Möglichkeit ist, dass einige Kerne nicht fusionieren, sondern degenerieren und die fusionierten Kerne erst die Meiose durchlaufen, wenn die Zygospore auskeimt. Die Keimung der Zygosporen erfolgt nach einer Ruheperiode mit einem Keimsporangium (Webster (1983)).

Die morphologischen Prozesse während des sexuellen Lebenszyklus von Zygomyceten werden am Beispiel von *M. mucedo* erklärt (siehe Abb.10). In der Laborkultur berühren sich nach drei Tagen Inkubation im Dunkeln die Myzelien der beiden Kreuzungstypen in der Mitte der Petrischale. Nach weiteren 10 h Inkubation bilden zwei benachbarte Hyphen unterschiedlicher Kreuzungstypen Ausstülpungen, sogenannte Zygophoren, die aufeinander zuwachsen und an ihren Enden verschmelzen. Die Progametangien bilden nach weiteren 10 h je eine Trennwand, die die Struktur in ein inneres Gametangium und zwei äußere Suspensoren trennt. Das Gametangium wächst heran, und die mittlere

## Einleitung

---

Zellwand löst sich auf. Die Zellinhalte verschmelzen, und die Zygosporangie wächst heran.  
Die ersten Zygosporangien sind 70 h nach Myzelienberührung sichtbar.

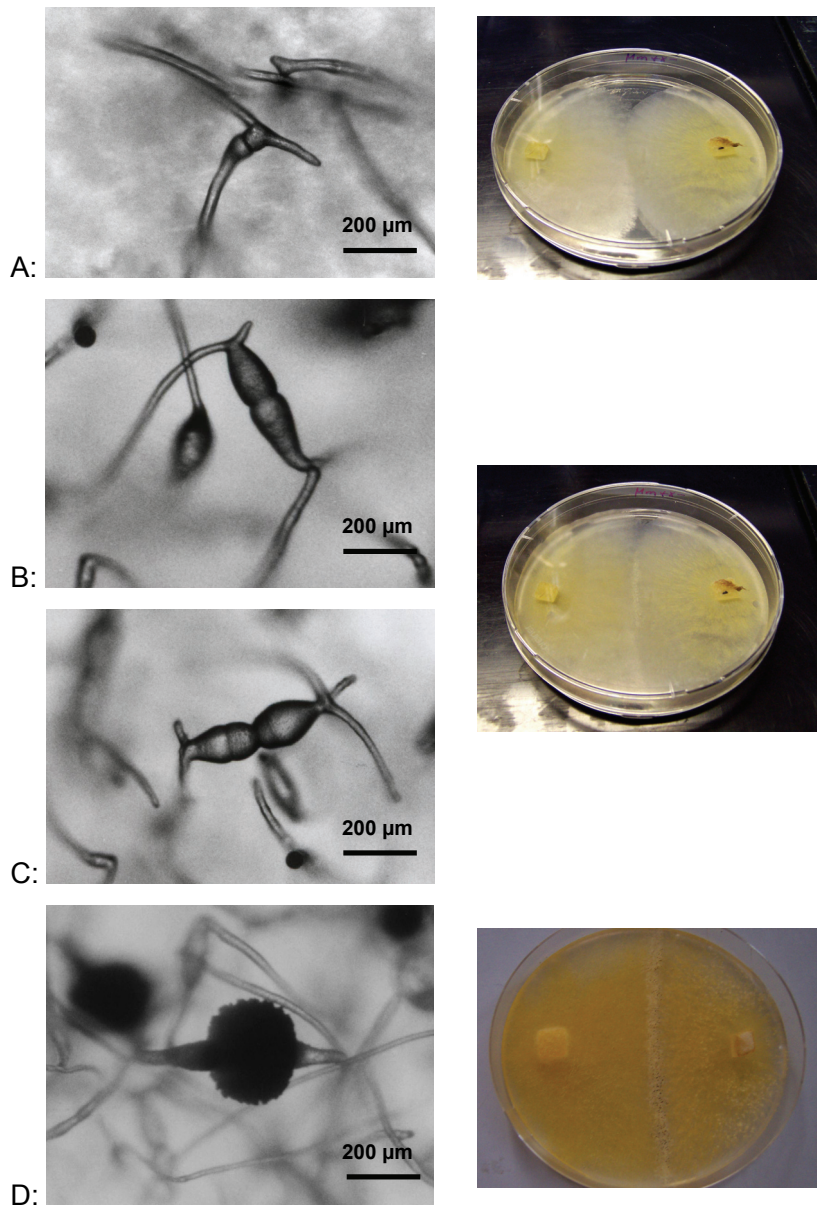


Abb.10: Morphologische Entwicklungsstadien des sexuellen Lebenszyklus von *M. mucedo* in der Petrischalenkultur. (Fotos M. Richter)

- A: fusionierende Zygothoren (10 h nach Myzelienberührung)  
B: heranwachsende Progametangien (20 h nach Myzelienberührung)  
C: Gametangium- und Suspensorien-Entstehung durch Septenbildung  
D: reife Zygosporangie zwischen zwei Suspensorien (70 h nach Myzelienberührung)

### 2.6. Ziele

Als Untersuchungsobjekte der vorliegenden Arbeit sollten die Zygomyceten *Blakeslea trispora* (+) FSU 331 und *Blakeslea trispora* (-) FSU 332 sowie *Mucor mucedo* (+) FSU 621 und *Mucor mucedo* (-) FSU 620 in Petrischalenkultur auf Festmedium dienen.

Biologische und chemische Untersuchungen sollten den Beweis erbringen, dass die Pheromone mit Trisporoid-Struktur über den Gasraum wirken.

Mit zweidimensionaler Raman-Spektroskopie sollten in intakten Pilzstrukturen Carotinoide lokalisiert werden. Die intrazelluläre Lokalisation von Carotinoiden als Trisporoidvorstufe sollte Hinweise auf den Synthesursprung der Pheromone geben.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten weiterhin typische, chemische Strukturelemente von Pheromonmolekülen ermittelt werden, die durch die Zygomyceten *B. trispora* und *M. mucedo* erkannt werden. Ein neu zu entwickelnder Biotest zur Carotininduktion sollte zur Aufstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen mit Hilfe synthetischer Trisporoidanaloga dienen. Mit solch einem quantitativen Biotest sollten die Erkennungssignale der beiden Zygomyceten-Vertreter während des sexuellen Lebenszyklus charakterisiert und verglichen werden.

Eine Expressionsanalyse sollte die Trisporoid-regulierten Gene ausfindig machen und näher charakterisieren. Das *tsp3*-Gen codiert für die putative Carotin-Oxygenase, die Carotin zu Trisporsäure-Vorstufen umwandelt. Die Regulation der Transkription von *tsp3* durch verschiedene Trisporoidanaloga sollte chemische Strukturmerkmale, die den Carotinabbau verstärken könnten, identifizieren.

Der Vergleich des Einflusses von Trisporoiden auf Carotinaufbau und -abbau sollte Hinweise auf Gemeinsamkeiten oder Unterschiede der chemischen Struktur der Signalmoleküle aufdecken und Schlussfolgerungen auf Aktivierungsprinzipien ermöglichen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Verwendete Materialien

##### 3.1.1. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Qiagen (Hilden, Deutschland) und Stratagene (La Jolla, USA) bezogen und wurden in analytischen Reinheiten verwendet. Die untersuchten Trisporoidanaloge wurden von Doreen Schachtschabel (MPI für Chemische Ökologie, Jena) synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Schachtschabel & Boland (2007)).

##### 3.1.2. Organismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen gehören zur Klasse der *Zygomycetes* (Jochpilze) und innerhalb dieser zur Ordnung der *Mucorales*. Die Pilzstämme werden unter den angegebenen Stammnummern im Pilzreferenzzentrum (FRC) der Friedrich-Schiller-Universität Jena geführt (siehe Tab.1).

Tab.1: Pilzstämme

CBS = Centraalbureau for Schimmelcultures (Utrecht, Niederland), FSU = Friedrich-Schiller-Universität (Jena, Deutschland), FRC = Pilzreferenzzentrum

Art (Kreuzungstyp)	Herkunftsbezeichnung	Stammnummer am FRC
<i>Blakeslea trispora</i> (+)	CBS 130.49	FSU 331
<i>Blakeslea trispora</i> (-)	CBS 131.49	FSU 332
<i>Mucor mucedo</i> (+)	CBS 144.24	FSU 621
<i>Mucor mucedo</i> (-)	CBS 109.16	FSU 620

#### 3.2. Kultivierung

##### 3.2.1. Stammhaltung

Die *M. mucedo* und *B. trispora* Stämme wurden auf SUP-Medium (Wöstemeyer (1985)) in Petrischalen mit einem Durchmesser von 9 cm bei 22 °C kultiviert. Sporen wurden in sterilem SUP-Flüssigmedium mit 20 % Glycerin von Petrischalen mit sporulierenden Reinkulturen abgeschwemmt. Sporen von *M. mucedo* wurden bei -20 °C eingefroren und Sporen von *B. trispora* wurden bei 4 °C gelagert. Alle Pilzstämme wurden aus

## Material und Methoden

---

Einzelsporen angezogen. Zum Nachweis der Carotinproduktion und Zygothorenbildung und Bestimmung der Transkriptlevel wurden die Pilzkulturen auf Induktionsmedium angezogen. Zur Gewinnung von Trisporoiden aus *B. trispora* wurde SUP-Flüssigmedium und Maltoselösung verwendet.

### 3.2.2. Medien

SUP-Medium (supplementiertes Minimalmedium) (nach Wöstemeyer (1985)):

10,0 g	Glukose
1,0 g	Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )
4,0 g	Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
0,9 g	Dikaliumhydrogenphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )
0,25 g	Magnesiumsulfatheptahydrat ( $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ )
5,0 g	Hefeextrakt
12,0 g	Agar (pulverisiert), bei SUP-Flüssigmedium nicht zugesetzt
1000 ml	A. dest.
1,0 ml	sterile 0,1 M $\text{CaCl}_2$ -Lösung nach dem Autoklavieren zugeben

Maltoselösung:

20,0 g	Maltose
0,1 g	Ammoniumdihydrogenphosphat ( $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ )
1000 ml	A. dest.

IM-Medium (Induktionsmedium) (modifiziert nach van den Ende (1968)):

I bis III wurden getrennt autoklaviert, anschließend zusammengeführt, vermischt und in Petrischalen gegossen

I)	10,0 g	Kaliumnitrat ( $\text{KNO}_3$ )
	5,0 g	Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
	2,5 g	Magnesiumsulfatheptahydrat ( $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ )
	1,0 g	Hefeextrakt
	200 ml	A. dest.
II)	12,0 g	Agar (pulverisiert)
	700 ml	A. dest.
III)	20,0 g	Maltose
	100 ml	A. dest.

### **3.3. Gewinnung natürlicher Trisporoide aus *Blakeslea trispora* durch Extraktion von Flüssigkulturen**

Die gereinigten Trisporoide aus Pilzkulturen dienten zur Stimulation von *M. mucedo* und *B. trispora* Kulturen. Für die Isolierung und Reinigung der Trisporoide waren die im Folgenden beschriebenen Schritte nötig.

#### **3.3.1. Vorkulturen**

Die Vorkulturen wurden in sterilen 500 ml Rundkolben mit 100 ml SUP-Flüssigmedium angezogen. Dazu wurden sechzig Kolben mit je drei ca. 0,5 cm<sup>2</sup> großen Myzelstücken mit Agarmedium von *B. trispora* FSU 331 des (+) Kreuzungstyps und sechzig Kolben mit *B. trispora* FSU 332 des (-) Kreuzungstyps beimpft. Die Ansätze wurden 3 Tage bei 22 °C mit 120 U/min auf Kulturschüttlern unter natürlichem Licht-Dunkel-Wechsel inkubiert.

#### **3.3.2. Kreuzkulturen**

Das Myzel eines Kolbens wurde steril filtriert und mit 30-40 ml steriler Maltoselösung gespült. Gleich behandeltes Myzel der komplementären Kreuzungstypen derselben Art wurde in einem sterilen 500 ml Rundkolben mit 100 ml Maltoselösung vereinigt. Die Kreuzkulturen wurden 5 Tage auf Kulturschüttlern im Dunkeln bei 22 °C inkubiert.

#### **3.3.3. Extraktion der Trisporosäure und ihrer Vorstufen**

Die Isolation der Trisporoide aus *B. trispora* durch Extraktion mit Trichlormethan folgt der Methode, die von van den Ende (1968) beschrieben wurde. Der Ablauf wurde modifiziert (Schimek *et al.* (2003)). Das Kulturmedium wurde durch Filtration gewonnen. Der pH-Wert des Mediums wurde mit 1 M NaOH auf pH 8 eingestellt. Ein Volumen pH 8-Medium wurde im Scheidetrichter mit einem halben Volumen Extraktionslösung aus Trichlormethan:Isopropanol (100:5) ausgeschüttelt. Nach der Trennung der 2 Phasen wurde die untere, klare, organische Phase in braunen Flaschen aufgefangen und mit Natriumsulfat versetzt, um dem pH 8-Extrakt das Restwasser zu entziehen.

Die obere, wässrige Phase wurde mit 15 % HCl auf pH 2 eingestellt und wie oben beschrieben behandelt. Die filtrierten pH 8- und pH 2-Extrakte wurden am Rotationsverdampfer vollständig eingeeengt (340 mbar, 45 °C), in 3-4 ml Ethanol aufgenommen und in kleinen braunen Fläschchen bei -20 °C gelagert.



Der gesamte Vorgang erfolgte im Halbdunkeln, um eine Lichtisomerisierung der photolabilen Trisporoide zu verhindern.

### 3.3.4. Photometrische Abschätzung der Trisporoidkonzentrationen

Von den ethanolischen pH 8- und pH 2-Gesamtextrakten wurde die Konzentration an Trisporsäuren und den Vorstufen, wie 4-Dihdromethyltrisorat über eine photometrische Messung (Jasco V-560 UV/VIS Spektralphotometer (Tokyo, Japan)) abgeschätzt. Die Proben wurden auf eine maximale Absorption von  $\leq 1$  bei 325 nm verdünnt und die Absorptionsmaxima bestimmt.

Für reine Trisporoide gilt nach Nieuwenhuis & van den Ende (1975):

$$E_{325\text{nm}}^{1\%/\text{cm}} = 572 \text{ (spezifischer Extinktionskoeffizient für Trisporsäure bei 325 nm)}$$

$$E_{282\text{nm}}^{1\%/\text{cm}} = 547 \text{ (spezifischer Extinktionskoeffizient für 4-DHMT bei 282 nm)}$$

Die Abschätzung der Konzentrationen an Trisporsäure bzw. 4-DHMT erfolgte nach folgenden Formeln:

$$(A_{325\text{nm}} \times 10 \text{ mg/ml}) / 572 = [\text{Trisporsäure}] \text{ mg/ml}$$

$$(A_{282\text{nm}} \times 10 \text{ mg/ml}) / 547 = [4\text{-DHMT}] \text{ mg/ml}$$

### 3.3.5. Reinigung der Trisporsäure aus Flüssigkulturextrakten durch Säulen- bzw. Dünnschichtchromatographie

Um Trisporsäure als Reinsubstanz zu erhalten, wurde der pH 2-Gesamtextrakt mittels präparativer Säulenchromatographie an Kieselgel (Silica 32-60, 60 Å, ICN, Eschwege) mit dem Laufmittel Petrolether:Ether aufgetrennt. Die Fraktionen wurden mittels analytischer Dünnschichtchromatographie (DC) und Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) (siehe Kapitel 3.5.2.) auf ihre Reinheit geprüft. Als zweiter Weg zur Reinigung der Trisporoide aus dem Gesamtextrakt diente die präparative DC. Dafür wurden Fertigplatten mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 2 mm (Merck, Darmstadt) verwendet. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht (254 nm). Mit der analytischen DC wurde anschließend eine Grobabschätzung der Reinheit durchgeführt. Durch den Laufstreckenvergleich mit einem Standard wurde die Substanz identifiziert. Zur analytischen DC wurden DC-Aluminiumfolien beschichtet mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 0,2 mm (Merck, Darmstadt) verwendet. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht (254 nm und 366 nm) durch Fluoreszenzauslöschung.

Mit Hilfe dieser Techniken konnten Trisporsäure B (**14**, Abb.14) und Trisporsäure C (**15**, Abb.14) aus *B. trispora* Flüssigkulturen gereinigt und in den Biotests eingesetzt werden.

### **3.4. Biotests zum Nachweis von flüchtigen Verbindungen und Trisporoiden aus Zygomyceten**

#### **3.4.1. Zygophorentest mit Trisporoiden und closed loop stripping-Extrakten**

Die biologische Aktivität von Trisporoiden und closed loop stripping (CLS)-Extrakten (siehe Kapitel 3.5.1.) wurde über die Induktion der Zygophorenbildung bei *M. mucedo* FSU 621 und FSU 620 ermittelt (Schimek *et al.* (2003)). Ein Myzelstück von *M. mucedo* wurde an den Rand einer Petrischale mit Induktionsmedium geimpft und 3 Tage im Dunkeln bei 22 °C inkubiert, so dass die Kulturplatte zur Hälfte bewachsen war. Ein Filterplättchen mit den zu testenden Substanzen wurde 2 mm vor der Wachstumsfront des Myzels platziert. Ein Stereomikroskop wurde genutzt, um nach 18 h Inkubation im Dunkeln bei 22 °C die Zygophoren im Myzel zu zählen. Das Ergebnis wurde nach 36 h überprüft.

#### **3.4.2. Nachweis flüchtiger, Zygophoren-induzierender Verbindungen**

Für den Nachweis flüchtiger Verbindungen aus Zygomyceten, die Zygophorenbildung induzieren, wurden zwei Petrischalenunterteile aneinander gelegt, ohne dass sich die Kulturmedien mit den Myzelien berührten.

Der *M. mucedo* Zygophoren-Biotest wurde abgewandelt, um die Existenz flüchtiger, bioaktiver Substanzen nachzuweisen. Dazu wurde im so genannten Fläschchentest ein niedriges Glasgefäß (D 1 cm x H 0,5 cm) 3 mm vor die Wachstumsfront in ein ausgeschnittenes Mediumareal gestellt, so dass die Mediumschicht unberührt blieb (siehe Abb.13). Zusätzlich wurden silanisierte Glasgefäße (D 1 cm x H 0,5 cm) verwendet, um Wasserbrücken zu verhindern.

Beide Tests verhinderten eine Diffusion der zu testenden Substanzen durch das Medium, wodurch die Effekte von flüchtigen, bioaktiven Verbindungen nachweisbar werden sollten, die durch die Luft zum Pilzmyzel diffundierten.

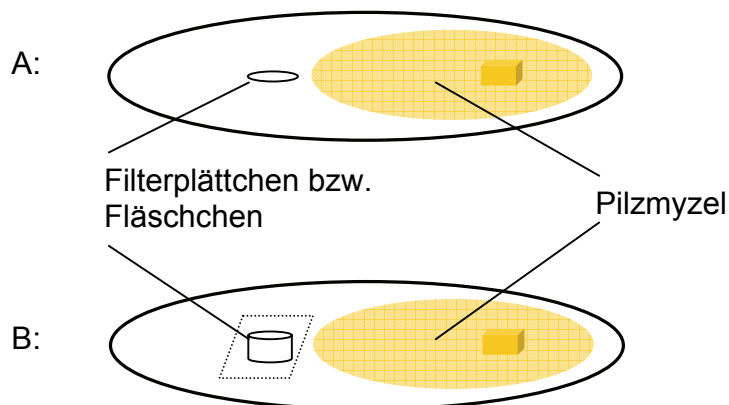


Abb.13: Experimenteller Aufbau des Zygophoren-Biotests mit Filterplättchen an der Wuchsfront des Pilzmyzels (A) und des Fläschchentests mit dem Glasgefäß 3 mm vor der Wuchsfront des Pilzmyzels (B) in einer Petrischale.

### 3.5. Chemische Analyse flüchtiger Verbindungen aus Zygomyceten

Flüchtige Verbindungen aus Zygomyceten-Kulturen wurden mittels der „closed loop stripping“ (CLS) Technik gesammelt. Die Pilzkulturen wurden auf Plastikpetrischalen mit Induktionsmedium kultiviert. Jeweils zwei Myzelstücke des (+) und zwei des (-) Kreuzungstyps wurden auf eine Petrischale übertragen und für 3 Tage dunkel inkubiert. Mit beginnender Berührung der Wachstumszonen wurde das CLS-Experiment gestartet.

#### 3.5.1. Closed loop stripping zum Anreichern flüchtiger Verbindungen

Für die CLS-Versuche wurden Miniatur-Drehschieberpumpen der Firma Fürgut (Aitrach, Deutschland) mit einer Nennspannung von 12 V und einer Betriebsspannung von 10 V eingesetzt. Die flüchtigen Verbindungen adsorbierten an Filtern mit einer Länge von 60 mm und einem Durchmesser von 5 mm. Als Adsorbtionsmaterial wurden 1,5 mg Aktivkohle (CLSA, le Ruisseau de Montbrun, Daumazan sur Arize, Frankreich) bzw. 10 mg SuperQ (Alltech GmbH, Unterhaching, Deutschland), ein Divinylbenzol-Polymer, benutzt.

Die zu untersuchenden Pilzkulturen wurden in Petrischalen im Exsikkator (D 10 cm) zur Sporenkeimung dunkel inkubiert (siehe Abb.12). Nach einer weiteren Inkubationszeit von 44 h in Dunkelheit wurden die Filter mit 2 mal 10 µl Dichlormethan mit 10 µg/ml  $\beta$ -Ionon ausgewaschen und der Extrakt per GC/MS (siehe Kapitel 3.5.2.) analysiert bzw. im Zygophorentest (siehe Kapitel 3.4.1) untersucht.

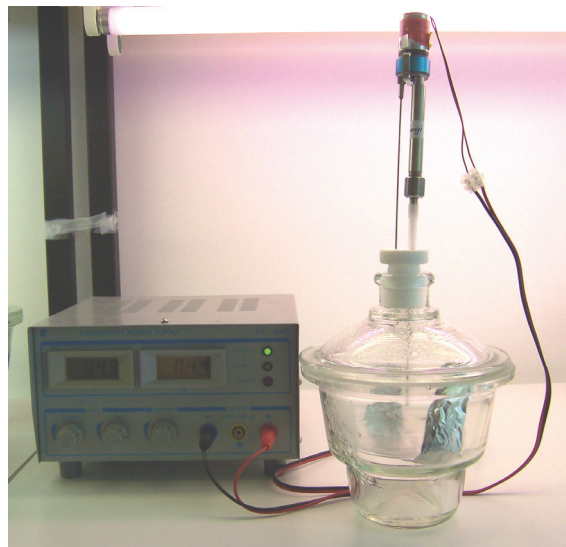
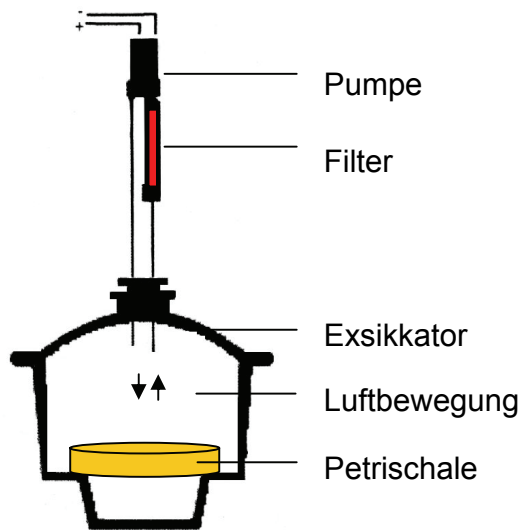


Abb.12: Versuchsaufbau des CLS-Experiments mit einer Petrischalenkultur im Exsikkator und angeschlossener Pumpe mit eingesetztem Filter zum Sammeln flüchtiger Verbindungen. Die Inkubation der Pilzkulturen erfolgte in Petrischalen im geschlossenen Glasexsikkator. Eine Pumpe wälzte den Luftraum im Exsikkator kontinuierlich um. Die über die Zeit emittierten, flüchtigen Verbindungen wurden auf einem Filter angereichert, eluiert und mittels GC/MS analysiert.

### 3.5.2. Gekoppelte Gaschromatographie/Massenspektrometrie zur Identifizierung von flüchtigen Verbindungen und Trisporoiden

Um die chemische Struktur von Referenzsubstanzen sowie den gesammelten Verbindungen nachzuweisen, wurde die gekoppelte Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) verwendet. Aufgrund der Molekül-typischen Fragmentierung im Massenspektrometer und dem Vergleich mit Referenzsubstanzen wurden chemische Verbindungen identifiziert. Die GC/MS-Spektren wurden mit dem Trace-Massenspektrometer mit einer Elektronenstoßionisierungs-Quelle und einem Quadrupol-Massenanalysator unter Verwendung einer GC-Säule DB 5 (15 m x 0,25 mm; 0,25 µm) (Alltech, Unterhaching, Deutschland) aufgenommen.

#### GC/MS-Bedingungen zur Analytik von Trisporoiden:

##### Programm 1:

Temperaturprogramm: 40 °C (2 min), 10 °C/min, 220 °C, 30 °C/min, 280 °C (1 min)  
Injektortemperatur: 220 °C  
Injektionsvolumen: 1 µl

## Material und Methoden

---

Solvent delay:	3 min
Splitverhältnis:	1:10
Splitfluß:	15 ml/min
Trärgas:	Helium; 1,5 ml/min
Detektorvolt:	350 V
Ionisierungsenergie:	70 eV
Scans pro Sekunde:	2,6
Scanbereich:	50 - 452 amu

### **Programm 2:**

Analog zu Programm 1 mit folgenden Änderungen:

Temperaturprogramm:	50 °C (1 min), 15 °C/min, 300 °C, 30 °C/min, 300 °C (1 min)
Injektortemperatur:	240 °C
Scans pro Sekunde:	2,9
Scanbereich:	50 - 400 amu

### **3.6. Lokalisation von Carotinoiden in lebenden Pilzstrukturen mit Raman-Spektroskopie**

Die zweidimensionale Raman-Spektroskopie wurde verwendet, um Verbindungen in ausgewählten Pilzstrukturen oder -regionen zu lokalisieren und zu visualisieren.

#### **3.6.1. Aufbau der Raman-Spektrometer**

Am Institut für Photonische Technologien (IPHT, Jena) wurden die Pilzhyphen auf Glasobjektträgern mit Deckgläschen in Wasser präpariert. Die lebenden Pilzpräparate wurden unter einem Konfokalmikroskop (System alpha 300 R, WITec) des Raman-Spektrometers betrachtet, um zweidimensionale Raman-Karten aufzunehmen. Micro-Raman-Spektren wurden mit einem LabRam HR Spectrometer (Jobin Yvon, Horiba) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm, die durch einen Argon-Ionen-Laser erzeugt wurde, gemessen. Das Laserlicht wurde durch ein 20-faches bzw. 100-faches Mikroskopobjektiv mit einem Punktdurchmesser von ca. 1 µm auf die Probe fokussiert. Die auf die Probe fallende Laserenergie betrug ca. 260 µW. Das um 180 °

zurückgestreute Ramansignal wurde mit einer Kamera (1024 x 512 Pixel), die bei 208 K arbeitete, detektiert.

Das Raman-Spektrometer im Institut für Physikalische Chemie der Universität Jena wies einen analogen Aufbau auf. Unterschiede ergaben sich in der Typangabe des Mikroskops (Olympus IX 70). Micro-Raman-Spektren wurden bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm, die durch einen frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser erzeugt wurde, gemessen. Die auf die Probe fallende Laserenergie betrug ca. 10 mW. Die Kamera arbeitete bei 220 K.

### **3.7. Quantitativer Nachweis von $\beta$ -Carotin mit Hochleistungsflüssigchromatographie**

$\beta$ -Carotin, produziert von *M. mucedo* und *B. trispora* (+) und (-) Stämmen (siehe Tab.1), wurde nach Behandlung mit Trisporoiden mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) getrennt und im Dioden-Array-Detektor (DAD) gemessen. Der neu entwickelte Biotest zur Carotininduktion diente der Aufstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen.

#### **3.7.1. Kultivierung und Behandlung von Pilzkulturen mit Trisporoiden**

Das gesamte Myzel einer Petrischale wurde mit der zu testenden Trisporoidlösung besprüht (siehe Abb.14), inkubiert und schließlich geerntet, extrahiert und mit HPLC getrennt und dabei im DAD die Absorption von  $\beta$ -Carotin gemessen. Die Einzelkulturen wurden aus Sporen (100/Platte) auf Induktionsmedium mit Zellophanfolie angezogen und für 96 h bei 22 °C dunkel inkubiert. Alle Trisporoidanaloga (siehe Abb. 14) waren in A. dest. mit 20 % Ethanol gelöst und wurden gleichmäßig und in definierter Menge (14  $\mu$ g/Platte, 56  $\mu$ g/Platte gelöst in 280  $\mu$ l/Platte) über die Petrischale mit dem jungen Pilzmyzel gesprüht. Die Verbindungen **18** bis **21** wurden zuvor in Aceton gelöst und anschließend in A. dest. mit 20 % Ethanol aufgenommen. Die 20 ml Zerstäuberflaschen wurden von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Die behandelten Kulturen wurden für 44 h bei 22 °C im Dunkeln inkubiert.

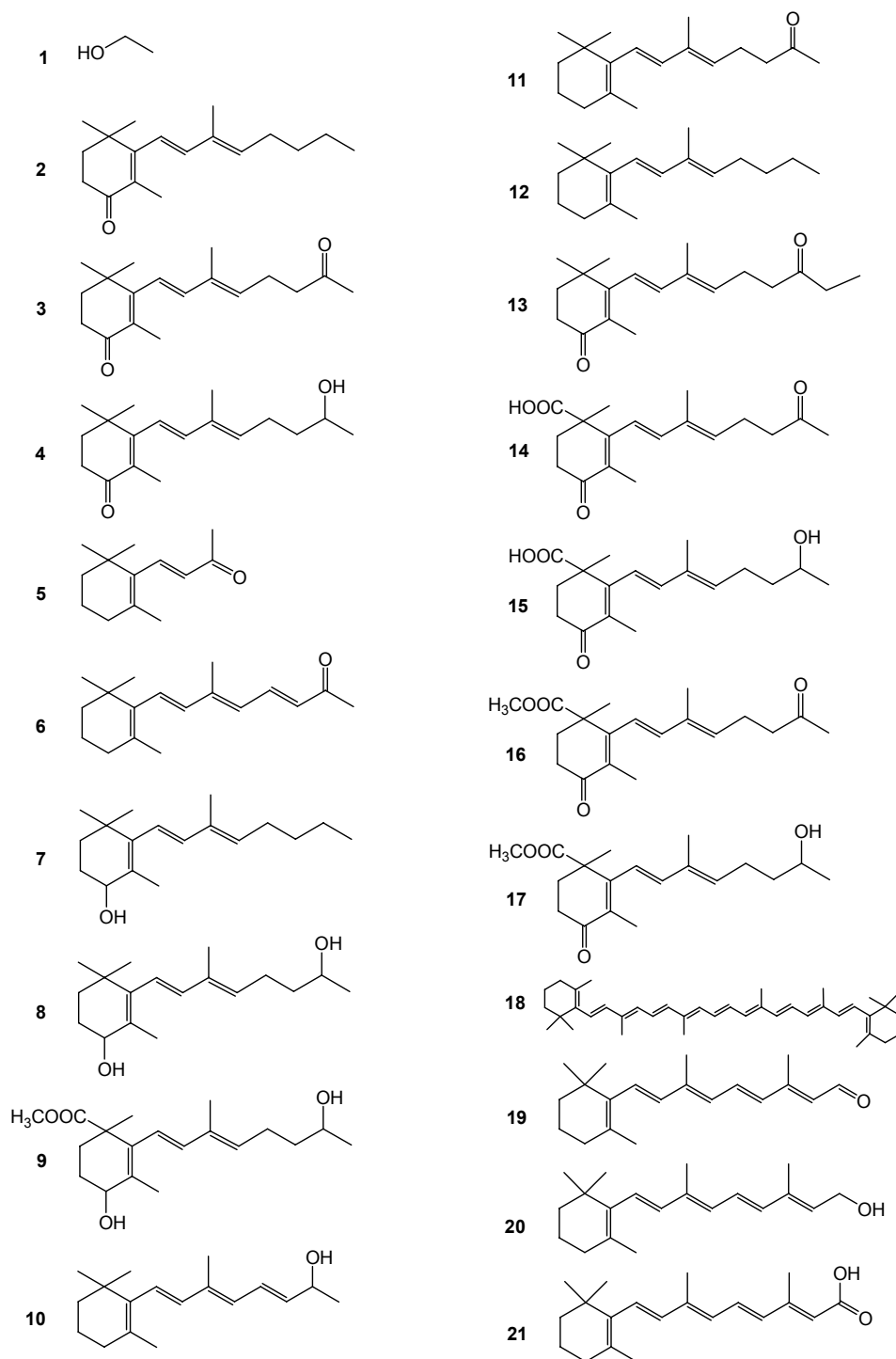


Abb.14: Strukturformeln aller in dieser Arbeit untersuchten Trisporoid-Verbindungen. Die Verbindungen **2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13** wurden durch Doreen Schachtschabel synthetisiert (Schachtschabel & Boland 2007). Die Verbindungen **5, 18, 19, 20, 21** wurden als HPLC-reine Standards käuflich erworben und die Verbindungen **9, 14, 15, 16, 17** wurden aus *B. trispora* (+)x(-) Flüssigkultur-Extrakten gereinigt. Alle Verbindungen lagen als Racemate in > 95%-iger Reinheit vor.

### 3.7.2. Carotin-Extraktion

Das geerntete Myzel wurde ohne Mediumbestandteile in Glasfläschchen übertragen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Frischgewicht des geernteten Myzels wurde bestimmt. Das Myzel einer Petrischale wurde im Glasfläschchen mit 300 ml Trichlormethan vollständig bedeckt. Das Pilzmyzel wurde in Trichlormethan unter Ultraschallbehandlung (Bandelin Sonorex Super RK 102H; Berlin, Deutschland) 10 min bei 38 °C extrahiert. Die organische Phase wurde mit HPLC getrennt und im DAD gemessen. Die HPLC-Fläschchen mit Glaseinsatz wurden von der Firma Supelco (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

### 3.7.3. Hochleistungsflüssigchromatographie

Die HPLC erfolgte unter Umkehrphasenbedingungen. Die C<sub>18</sub> Umkehrphasensäule wurde mit einem Aceton:Wasser-Gradienten bei 22 °C mit 1 ml/min Fluss eluiert (siehe HPLC-Bedingungen). Die Methode wurde nach Büch *et al.* (1994) modifiziert. Die Messung erfolgte mit einem DAD im Bereich von 200 bis 600 nm. Bei 453 nm, dem Absorptionsmaximum von  $\beta$ -Carotin in Aceton, wurde ein Chromatogramm über die Messzeit von 26 min dargestellt. Die  $\beta$ -Carotinkonzentrationen der Probe wurden mit Hilfe einer Kalibrierungsgeraden bestimmt. Die Kalibrierungsgerade wurde durch Absorptionsmessung von 5 verschiedenen  $\beta$ -Carotinkonzentrationen mit 0,001 µg/µl  $\beta$ -Carotinal bestimmt. Die Extraktion und Messung erfolge unter abgedunkelten Bedingungen.

#### HPLC-Bedingungen zur Quantifizierung von $\beta$ -Carotin:

Trennsäule:	Umkehrphasen C <sub>18</sub> Säule (CC 250/4 Nucleosil 120-5 C <sub>18</sub> , Macherey-Nagel, Düren, Germany)
Vorsäule:	CC 8/4 Nucleosil 120-5 C <sub>18</sub> (Macherey-Nagel, Düren, Germany)
Injektionsvolumen:	20 µl
Mobile Phasen:	A = A. dest.; B = Aceton
Gradient:	70 % Aceton, in 10 min auf 100 % Aceton, 5 min 100 % Aceton, in 1 min zurück auf 70 % Aceton für 10 min
Flussrate:	1,0 ml/min
Retentionszeit:	12,5 min ( $\beta$ -Carotin)
HPLC System:	Kontron 525 Pumpe, 560 Autosampler, 440 Dioden-Array-Detektor



Für die Berechnung der skalierten  $\beta$ -Carotingehalte wurden alle  $\beta$ -Carotingehalte auf die Ethanolkontrolle normiert sowie der Mittelwert und Standardfehler berechnet. Der Carotingehalt der Ethanolkontrolle bildete folglich mit 1,00 den Bezugswert. Wenn nach Abzug des Standardfehlers vom skalierten Carotingehalt der Wert von 1,00 überschritten wurde, war ein über den natürlichen Level erhöhter Carotingehalt der Pilzkultur bewiesen. Eine Testsubstanz, die diesen erhöhten Carotingehalt auslöste, wurde als Carotin-induzierend charakterisiert.

### 3.8. Analyse der Genexpression mit quantitativer real-time PCR

#### 3.8.1. Kultivierung und Behandlung mit Trisporoiden

Die Petrischalen mit festem Induktionsmedium wurden vollständig mit Zellophanfolie belegt. Einzelkulturen von *M. mucedo* FSU 620 bzw. 621 und *B. trispora* FSU 331 bzw. 332 wurden darauf 90 h bei 22 °C aus Sporensuspension (100 Sporen/Platte in 100  $\mu$ l) angezogen. Nach dem Besprühen mit einer Trisporoidlösung (14 bzw. 56  $\mu$ g/Platte gelöst in 280  $\mu$ l/Platte) wurde die Pilzkultur in Dunkelheit bei 22 °C inkubiert.

#### 3.8.2. RNA-Isolation

Das Pilzmyzel wurde in einer RNase-freien Umgebung geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Myzel wurde in einer RNase-freien Reibeschale zu feinem Pulver zerkleinert. Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Plant Mini kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) aus dem zerkleinerten Pilzmyzel isoliert (ca. 500 mg *M. mucedo* Myzel/Platte, ca. 650 mg *B. trispora* Myzel/Platte). Eine DNA-freie RNA Präparation wurden durch die Behandlung mit 30 Units RNase free DNase I (Quiagen, Hilden, Deutschland) pro Reaktion gesichert.

#### 3.8.3. Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Zur Bestimmung der Konzentration an RNA wurde die Absorption mittels UV-VIS in verdünnten Proben bei 260 nm bestimmt.

Die Konzentration an DNA oder RNA wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{RNA in } \mu\text{g / ml} = \text{Absorption bei 260 nm} \times 40 \mu\text{g / ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Eine Absorption von 1,0 entspricht etwa einer Konzentration von 40 µg/ml ssDNA (Einzelstrang DNA) bzw. RNA. Der Messwert bei 280 nm diente zur Abschätzung des Anteils von mitgereinigtem Protein. Bei Werten von 1,8 bis 2,0 wurde von einer hinreichend niedrigen Proteinkontamination ausgegangen (Angaben nach Sambrook *et al.* (1989)).

### **3.8.4. Reverse Transkription**

Die cDNA wurde durch reverse Transkription aus der isolierten Gesamt-RNA hergestellt. Der verwendete oligo (dT) Primer stellte sicher, dass nur transkribierte mRNA umgeschrieben wurde. Für die cDNA-Synthese wurde das SuperScript III First Strand Kit, bestehend aus SuperScript III Reverse Transkriptase (200 Units /µl), 5X First-Strand Puffer (250 mM Tris-Salzsäure (pH 7,5), 375 mM Kaliumchlorid (KCl), 15 mM Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>)) und 0,1 M Dithiothreitol (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), verwendet. Ein Reaktionsansatz von 12 µl enthielt 1 µg Gesamt-RNA, 0,83 mM dNTPs und 0,5 µg oligo (dT) Primer in 0,6 mM Tris-chlorid (pH 7,5). Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 65 °C wurde der Reaktionsansatz vervollständigt durch die Zugabe von 4 µl Puffer aus 250 mM Tris-chlorid (pH 7,5), 375 mM Natriumchlorid und 15 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Dithiothreitol und 50 Units SuperScript III Reverse Transkriptase und für 55 min bei 50 °C inkubiert. Das Enzym wurde durch Erhitzen auf 70 °C für 15 min inaktiviert.

### **3.8.5. Real-time PCR**

Die real-time PCR Messungen mit der gewonnenen cDNA wurden mit dem Mx3000P real-time PCR system (Stratagene, LaJolla, CA, USA) durchgeführt.

Basierend auf den Sequenzen der Gene für Aktin, HMG-CoA-Reduktase, Phytoen-Dehydrogenase, der putativen Carotin-Oxygenase und 4-DHMT-Dehydrogenase wurden spezifische Primer mit Annealingtemperaturen zwischen 55 und 59 °C mit Hilfe des Internet-Anwendungsprogramms Primer3 (URL: "[http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)") entworfen. Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert (Tab.2).

## Material und Methoden

Tab.2: Primer-Sequenzen und Produktlängen, die für die transkriptionelle Analyse mittels real-time PCR verwendet wurden.

Mm = *M. mucedo*, Bt = *B. tripora*, vor = Vorwärts-Primer, rück = Rückwärts-Primer, act = Aktin-Gen, carB = Phytoen-Dehydrogenase-Gen, hmgR = HMG-CoA-Reduktase-Gen, tsp1 = 4-DMHT-Dehydrogenase-Gen, tsp3 = Carotin-Oxygenase-Gen

<b>Primernamen</b>	<b>Sequenz (5' zu 3')</b>	<b>Produktlänge (bp)</b>
Mm act vor	cgt gct cct gaa gct ctc tt	181
Mm act rück	ctt ctg cat acg gtc agc aa	
Mm hmgR1 vor	tgg ctt cta cag cca gag gt	170
Mm hmgR1 rück	acc cgt cac aat tgc ttc tc	
Mm hmgR2 vor	acg gaa ggt tgt ttg att gc	242
Mm hmgR2 rück	gcc att gca acc ttc atc tt	
Mm tsp1 vor	cca agc tct gga aca cct tc	144
Mm tsp1 rück	agt cac gac cag cca tat cc	
Bt act vor	ccc gtt ctc ttg act gaa gc	250
Bt act rück	agt cac gac cag cca tat cc	
Bt hmgR vor	tgc cag agg ttg taa agc aa	229
Bt hmgR rück	gac tag acg acc ggc aag ag	
Bt carB vor	cgc ttg cac ttg ttt ggt aa	192
Bt carB rück	cat gtt gaa acc acc acg ag	
Bt tsp3 vor	att ggt cat cct ttc gat gg	247
Bt tsp3 rück	act cgg gat cat gtt ctt gc	
Bt tsp1 vor	gcc aag act ttg acc ttg ga	211
Bt tsp1 rück	ccc act tga cca aac gat ct	

Für die Amplifikation wurden 21 µl Gesamtansatz hergestellt, bestehend aus 12,5 µl 2X Master Mix mit SureStart Taq DNA Polymerase (Kit "Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix", Stratagene), 8,125 µl sterilem Wasser und 0,375 µl 1:500 verdünntem Carboxytetramethylrhodamin als passivem Referenz-Farbstoff mit je 1 µl des Vorwärts- und Rückwärts-Primers in einer Endkonzentration von 100 nM und 2 µl template cDNA. Wenn vom Idealfall ausgegangen wird, dass in der RT-Reaktion 1 µg RNA zu 1 µg cDNA umgesetzt wird, entspricht das 0,05 µg/µl cDNA in einem 25 µl-Ansatz.

Die PCR wurde durch Aktivierung der Taq Polymerase bei 95 °C für 10 min gestartet und mit 40 Zyklen, bestehend aus Denaturierung für 30 Sekunden bei 95 °C, Annealing für 1 min bei 55 °C und Elongation für 1 min bei 72 °C, fortgeführt. Für jede Probe wurden Doppelbestimmungen pro Messdurchgang durchgeführt.

Die direkte Korrelation zwischen der gemessenen SYBR Green Fluoreszenz und der Anreicherung von PCR-Produkt wurde durch Aufzeichnen der Dissoziationskurve überprüft. Die Dissoziationskurven wurden gemessen, um eventuelle Fehlpaarungen von Primern festzustellen. Für eine zusätzliche Kontrolle der PCR-Produkte wurden 1,5 %-ige Agarose-Gele (1,5 g Agarose, 100 ml 1x Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat (TAE)-Puffer, 2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)) und 100 bp DNA Leiter bzw. PCR Marker (New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland) zum Größenvergleich verwendet. Außerdem diente eine Sequenzierung von gereinigtem PCR-Produkt durch die Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) zur Funktionskontrolle der Primer (siehe Anhang).

Das Amplifikationsergebnis wurde mit der Mx3000P Software (Stratagene, La Jolla, USA) analysiert. Die Ergebnisse wurden mit einer vergleichenden Methode, beschrieben bei Livak & Schmittgen (2001), berechnet und basierend auf den Ergebnissen für Aktin als endogene Kontrolle quantifiziert. Aktin wird als housekeeping Gen bezeichnet, da es in allen Zellen und Stadien gleich intensiv exprimiert wird. Deshalb kann es als Referenzgen verwendet werden, um den Grundlevel der Expression in der Zelle zu ermitteln.

Die verwendete Formel lautet:

$$\text{Gentranskription bzw. mRNA-Menge} = 2^{(-\Delta CT)}$$

Die Differenz  $\Delta$  wurde zwischen der Transkription des zu untersuchenden Gens und des Aktin-Referenzgens ermittelt. CT war dabei die Zyklenanzahl der real-time PCR, bei der die Fluoreszenz über den Schwellenwert anstieg.

Für die Berechnung der relativen Gentranskription wurden alle Transkriptionswerte auf die Ethanolkontrolle normiert und anschließend der Mittelwert und Standardfehler berechnet.

### 3.9. Statistische Berechnungen

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm Microsoft Excel. Die Standardabweichungen und der Standardfehler der Daten einer Messreihe wurden berechnet sowie der Student'sche t-Test angewendet. In den folgenden Abbildungen dieser Arbeit wurden die Standardfehler dargestellt.

Die Standardabweichung ist ein absolutes Maß für die Streubreite der Ergebnisse einer Messreihe, mit dem sich der Zufallsfehler von Analysenmethoden charakterisieren lässt.

Zur Berechnung diene die Formel:

$$s = \sqrt{((n\sum x^2 - (\sum x)^2) / (n(n-1)))}$$

Dabei bedeuten  $\bar{x}$  = Mittelwert,  $n$  = Anzahl der Messwerte,  $s$  = Standardabweichung.

Der Standardfehler gibt die Streuung der Daten bezogen auf die Stichprobenmenge an.

Zur Berechnung diene die Formel:

$$\text{Standardfehler} = s / \sqrt{n}$$

Dabei bedeuten  $n$  = Anzahl der Messwerte,  $s$  = Standardabweichung.

Um signifikante Unterschiede zwischen Messreihen (Kontrollgruppe, Probengruppe) zu ermitteln wurde der t-Test durchgeführt. Mathematisch gesprochen beurteilt dieses Verfahren, ob sich zwei untersuchte Gruppen systematisch in ihren Mittelwerten unterscheiden.

$$t = \frac{|\bar{x} - \mu|}{s / \sqrt{n}}$$

Dabei bedeuten  $\bar{x}$  = Mittelwert der Probengruppe,  $\mu$  = Mittelwert der Kontrollgruppe,  $s$  = Standardabweichung,  $n$  = Anzahl der Messwerte.

Die Auftretenswahrscheinlichkeit  $P$  eines positiven  $t$ -Werts entspricht dem Anteil der Fläche unter der Daten-Verteilungskurve, den der  $t$ -Wert nach rechts abschneidet. Ein Signifikanzniveau von 5 % wurde angenommen. Demnach unterscheiden sich die Messreihen signifikant voneinander, wenn der errechnete Wert  $P$  kleiner als 0,05 ist, und die Probengruppe zeigt dann einen echten, signifikanten Effekt. Die  $P$ -Werte sind im Ergebnisteil angegeben und symbolisch mit \* für  $P \leq 0,05$ , \*\* für  $P \leq 0,01$  und \*\*\* für  $P \leq 0,001$  verdeutlicht.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. *Mucor mucedo* Kreuzkulturen produzieren flüchtige Trisporoide

Die Existenz gasförmiger, Zygomyceten-induzierender Pheromone wurde bisher ausschließlich durch biologische Methoden untersucht und nicht näher charakterisiert. Trisporinsäure, als Zygomyceten-induzierende Verbindung, ist aufgrund ihres niedrigen Dampfdrucks schwach flüchtig. Andere Trisporinsäure-Vorstufen könnten aufgrund eines höheren Dampfdrucks eine größere Reichweite haben und eine Zygomycetenbildung über die Luft induzieren. Wegen ihrer chemischen Struktur ist es möglich, dass Keton- oder Ester-Vorstufen der Trisporinsäure gasförmig vorliegen und als Pheromone über die Luft wirken.

Ein Ziel dieser Arbeit war der Nachweis flüchtiger Verbindungen aus Zygomyceten-Petrischalenkulturen. Zuerst sollte der biologische Beweis flüchtiger Pheromone im Kultivierungssystem geführt werden. Anschließend sollten flüchtige Substanzen aus Pilzkulturen im CLS-System angereichert und per GC/MS analysiert werden.

#### 4.1.1. Zygomyceten-induzierende, gasförmige Wirkstoffe lassen sich im Biotest nachweisen

Zu Beginn wurden Biotests entwickelt, um zu klären, ob und in welchem Kultursystem flüchtige, Zygomyceten-induzierende Wirkstoffe, vorhanden sind. Die folgenden Biotests wurden als 3-fach-Wiederholungen durchgeführt und das Ergebnis dadurch abgesichert. Zwei beimpfte Petrischalen-Unterteile mit Festmedium wurden aufeinander gestellt und mit oder ohne Parafilm abgedichtet, inkubiert (siehe Abb.22). Eine Hälfte war mit einer *M. mucedo* Kreuzkultur beimpft, die andere mit einer Einzelkultur. Beide Myzelien waren 1,5 cm voneinander entfernt. In der Einzelkultur entwickelten sich nach 24 h Inkubation gleichmäßig verteilt über die gesamte Platte Zygomyceten. Die mit Parafilm abgedichteten Platten wurden senkrecht gestellt, die unverdichteten waagrecht. Eine Substratverbindung war in jedem Fall ausgeschlossen, so dass die Zygomyceten-induzierenden Wirkstoffe nur über die Gasphase das Myzel der zweiten Petrischale erreichen konnten. Flüssigkeitsbrücken zwischen den Petrischalen wurden nicht beobachtet. Als Negativkontrolle dienten zwei gekoppelte Einzelkulturen, bei denen keine Zygomycetenbildung auftrat. Das Ergebnis ist ein biologischer Beweis, dass Pheromone aus Kreuzkulturen über die Gasphase wirken.

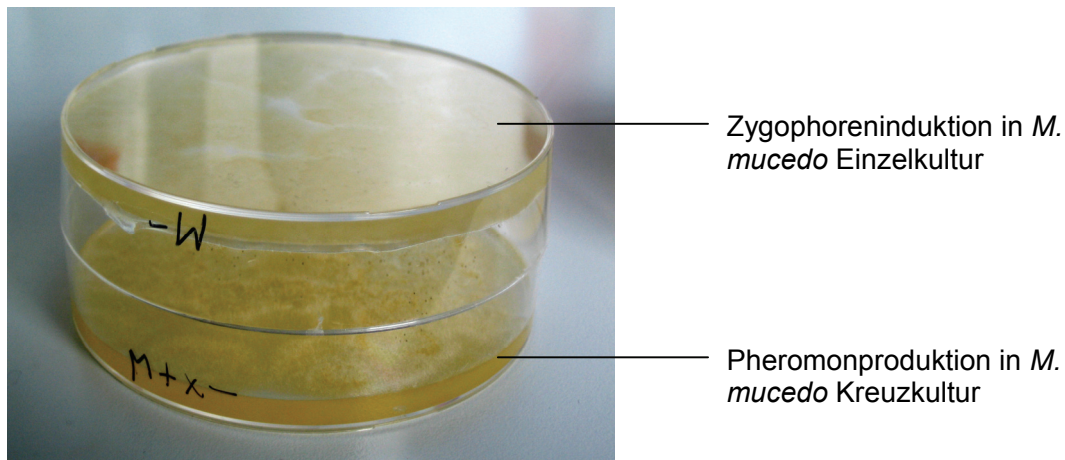


Abb.22: Biotest zum Nachweis flüchtiger Pheromone. Beimpfte und gekoppelte Petrischalenunterteile mit jeweils einer Kreuzkultur und einer Einzelkultur von *M. mucedo* bewiesen durch Bildung von Zygophoren in der Einzelkultur eine Wirkung der Pheromone der Kreuzkultur über die Gasphase. Der Abstand der Myzelien in den Petrischalen betrug 1,5 cm.

In einem weiteren Experiment wurde ebenfalls eine Zygophorenbildung induziert, obwohl keine Substratverbindung zwischen Myzel und Extrakt bestand. Der dazu verwendete Fläschchentest wurde aus dem Zygophoren-Biotest entwickelt. Beim Zygophoren-Biotest wurde ein Filterplättchen mit dem Wirkstoff auf dem Medium platziert. Der Wirkstoff konnte über das Medium diffundieren. Beim Fläschchentest war diese Diffusion über das Medium ausgeschlossen, dennoch induzierten ausgewählte Substanzen eine Zygophorenbildung. Als Kontrolle wurden Ethanol (**1**, Abb.14) und reine Trisporinsäure B (**14**, Abb.14) appliziert. Beide Verbindungen lösten keine Zygophorenbildung im Fläschchentest aus. Der vom Zygophoren-Biotest abgewandelte Fläschchentest bewies so die Existenz flüchtiger Wirkstoffe.

Pilzextrakt, das zuvor aus *B. trispora* (+)x(-) Flüssigkulturen gewonnen wurde, zeigte im Fläschchentest Zygophoren-induzierende Wirkung (siehe Abb.23). Mit geringerer Verdünnung der enthaltenen Trisporoide stieg auch die Anzahl gebildeter Zygophoren. Die Zygophoren-auslösenden Verbindungen wurden demzufolge in *B. trispora* Kreuzkulturen gebildet und können aufgrund ihrer Wirkung als flüchtige Pheromone bezeichnet werden. Die höchste Konzentration an Zygophoren trat an der Agar-Schnittkante, also an der nächsten Stelle zur Pheromonquelle, auf.

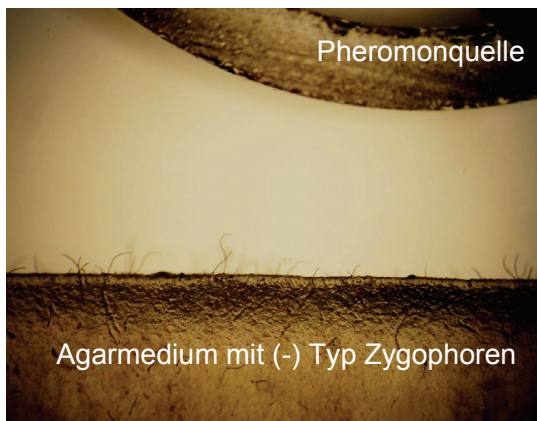
Die Reinsubstanzen Trisporin A (**2**) und B (**3**) (Abb.14) wurden auf ihre Wirksamkeit über die Gasphase getestet. Bei Applikation von 1 mg Trisporin A (**2**) bzw. 40 µg Trisporin B (**3**) im Fläschchentest wurde eine eindeutige Zygophorenbildung als dichter Rasen im

## Ergebnisse

---

(+) Kreuzungstyp beobachtet. Auch bei Verwendung silanisierter Glasfläschchen, die Wasserbrücken verhinderten, wurde die Zygophoreninduktion beobachtet. Dieselbe Reaktion, aber mit größerer Zygophorenanzahl, erfolgte durch Diffusion über das Medium im Zygophoren-Biotest. Der (-) Kreuzungstyp wurde nicht durch Trisporin A (**2**) bzw. Trisporin B (**3**) beeinflusst. Das Ergebnis bestätigt, dass Trisporin A und B ausschließlich auf den (+) Kreuzungstyp wirken. Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Trisporin A und B über die Gasphase wirken können. So wie die Kontrolle Ethanol (**1**) und Trisporinsäure B (**14**) induzierte 1 mg Trisporin C (**4**) keine Zygophorenbildung im Fläschchentest.

A:



B:

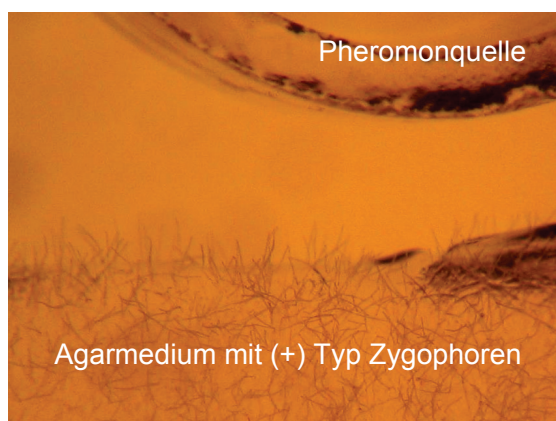


Abb.23: Fläschchen-Biotest zum Nachweis flüchtiger Pheromone. Nach Einwirkung von Pilzextrakt über die Gasphase bildeten *M. mucedo* (-) (A) und *M. mucedo* (+) (B) Zygophoren an der Agarschnittkante.

### 4.1.2. Analytischer Hinweis auf gasförmige Trisporoide

Nachdem der biologische Nachweis flüchtiger Wirkstoffe gelungen war, sollte ein chemisch-analytischer Nachweis flüchtiger Trisporoide folgen, der bisher noch nicht in der Literatur beschrieben wurde. Mittels CLS angereicherte, flüchtige Verbindungen aus *M. mucedo* Kulturen wurden per GC/MS identifiziert.

Zur Überprüfung des Messsystems diente das kurzkettige, flüchtige  $\beta$ -Ionon als Referenzsubstanz, da es gut mit CLS extrahierbar und per GC/MS identifizierbar war. Als Kontrollen dienten unbeimpfte Petrischalen mit Induktionsmedium im Exsikkator. Weichmacher im Plastikmaterial und Verbindungen aus dem Kulturmedium ergaben Signale flüchtiger Verbindungen in den Kontrollen. Pilzkulturen produzierten flüchtige Verbindungen, die als zusätzliche Signale in den Gaschromatogrammen auftraten. Mit Hilfe ihrer Massenspektren und dem Vergleich mit Referenzsubstanzen wurden



Hinweise auf die chemische Struktur der flüchtigen Verbindungen aus den Pilzkulturen erhalten. Einige natürliche Trisporoide lösen als Reinsubstanzen eine Zygophorenbildung aus. Die Zygophoren-induzierende Eigenschaft von Pilzextrakten besteht demzufolge aufgrund der enthaltenen Trisporoide. Dabei ist nicht auszuschließen, dass Trisporoid-fremde Verbindungen ebenfalls Zygophoren-induzierende Wirkung haben. Hinweise zur Abgabe langkettiger Alkohole, wie 1-Oktadecanol oder 1-Oktanol, aber auch Cyclohexen oder 2,6-Dimethylcyclohexanon wurden erhalten. Diese Verbindungen zeigten im Zygophoren-Biotest jedoch keine Pheromonwirkung. Für die weitere chemische Analyse beschränkt sich diese Arbeit auf flüchtige Trisporoide, die Zygophoren-induzierende Eigenschaften besitzen und demzufolge potentielle Pheromone darstellen.

Mit dem Zygophoren-Biotest konnte nachgewiesen werden, dass CLS-Extrakte aus Aktivkohlefiltern von *M. mucedo* Kreuzkulturen Zygophoren-induzierende Eigenschaften in (+) und (-) Kulturen besaßen. Demzufolge mussten gasförmige Pheromone von den Kreuzkulturen produziert worden sein.

Das CLS-GC/MS-Experiment mit 3 Tage alten *M. mucedo* Kreuzkulturen ergab, bei einer Sammelzeit von 44 h, den Hinweis auf ein flüchtiges Ketotrisporoid (**11**, Abb.14). Die Massenspektren der Referenzsubstanz **11** und der Verbindung des Peaks in der Pilzprobe stimmten weitgehend überein (siehe Abb.24). Die Mediumkontrolle enthielt den Trisporoid-Peak nicht. Somit wurde die Herkunft aus einer Kontamination ausgeschlossen. Das Experiment wurde als 4-fach-Wiederholung durchgeführt. Die Retentionszeit für das Ketotrisporoid in einer Wiederholungsmessung lag bei 10,87 min und stimmte mit einem Peak in der *M. mucedo* Kreuzkultur überein, so dass es sich um dieselbe Verbindung handeln konnte (siehe Abb. 25). Das MS ähnelte stark dem MS der Verbindung **11**. Der relevante Peak bei der Retentionszeit von 10,88 min enthielt vermutlich mehrere Verbindungen und unter anderem das Ketotrisporoid (**11**). Folglich waren mit CLS-GC/MS flüchtige Trisporoide reproduzierbar aus *M. mucedo* Kreuzkulturen nachweisbar.

Das flüchtige Ketotrisporoid (**11**) wurde nur in Kreuzkulturen gefunden und nicht in Einzelkulturen von *M. mucedo* (siehe Abb. 24), konnte aber sowohl auf Aktivkohle- als auch auf SuperQ-Filtern gesammelt werden. *B. trispora* Kreuzkulturen bildeten, ebenso wie *M. mucedo* Einzelkulturen, bei gleichen experimentellen Bedingungen keine nachweisbaren Mengen an flüchtigen Trisporoiden.

## Ergebnisse

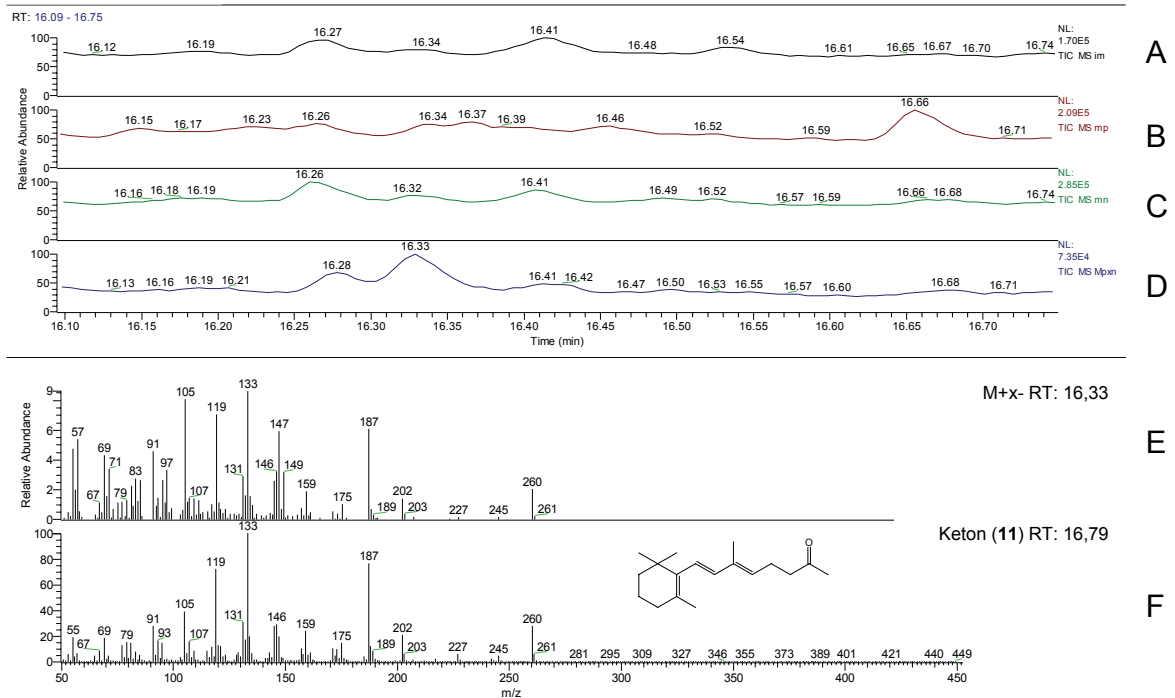


Abb.24: Die CLS-GC/MS-Messung mit einem SuperQ-Filter gibt durch Referenzvergleich einen Hinweis auf die Bildung eines flüchtigen Ketotrisporoids (**11**) in einer *M. mucedo* Kreuzkultur. In Einzelkulturen konnte kein Hinweis auf die Bildung des flüchtigen Ketotrisporoids (**11**) gefunden werden. (Programm 1)

- A: GC der Medium-Kontrolle
- B: GC von *M. mucedo* (+)
- C: GC von *M. mucedo* (-)
- D: GC von *M. mucedo* (+)x(-)
- E: MS für den Peak bei 16,33 min in *M. mucedo* (+)x(-)
- F: MS der Referenzsubstanz Ketotrisporoid (**11**)

## Ergebnisse

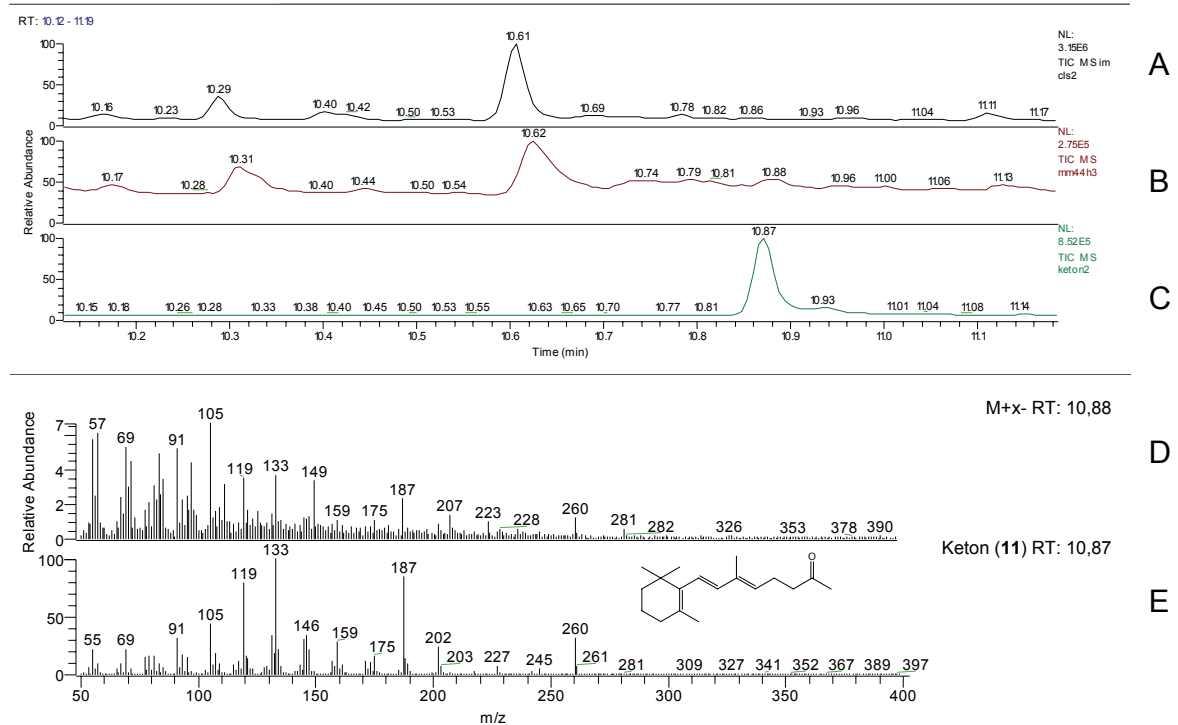


Abb.25: Die CLS-GC/MS-Messung gibt einen Hinweis auf die Produktion flüchtiger Trisporoide in *M. mucedo* Kreuzkulturen. (Programm 2)

- A: GC der Medium-Kontrolle
- B: GC der *M. mucedo* Kreuzkultur
- C: GC des Ketotrisporoids (11)
- D: MS für den Peak bei 10,88 min in der *M. mucedo* Kreuzkultur
- E: MS der Referenzsubstanz 11

Das Ketotrisporoid (11) löste bei Applikation von 15 und 30 µg/Platte in *M. mucedo* (+) Zygomorphbildung aus, jedoch nicht im (-) Typ. Die Verbindung 11 hat von allen Trisporensäure-Vorstufen den höchsten Dampfdruck und könnte deshalb ein entscheidendes, über die Luft wirksames Signalmolekül für den (+) Kreuzungstyp sein.

### 4.2. Nachweis und Lokalisation von Carotinoiden mit zweidimensionaler Raman-Spektroskopie

Die Moleküle einer Probe besitzen charakteristische Rotations-, Schwingungs- und Photon oder Spinflip-Energien, die als Frequenzunterschiede zum eingestrahlten monochromatischen Licht im Raman-Spektrometer detektiert werden. Zweidimensionale Mikro-Raman-Spektroskopie ist eine nicht invasive, bildgebende Analysetechnik für *in situ* Studien von mikroskopisch betrachtbaren Objekten. Die Raman-Spektroskopie ermöglicht eine Untersuchung von Präparaten in wässriger Umgebung. Die Technik bietet die Möglichkeit individuelle Verteilungsmuster charakteristischer Verbindungen in intakten Organismen zu untersuchen. Für zweidimensionale Raman-spektroskopische Abbildungen wurden Punkt-für-Punkt-Messungen durchgeführt und so Karten für die Substanzverteilung im Organismus erstellt.

Nachdem die Existenz und Abgabe von Trisporoiden aus Pilzhypen von *M. mucedo* bestätigt wurde, sollte der mögliche Ort der Synthese der Trisporoide innerhalb der Pilzhypen bestimmt werden. Eine Resonanz-Raman-Spektroskopie bei 325 nm für Trisporsäure war nicht möglich, da nur Laser mit einer Anregungswellenlänge von 532 und 488 nm zur Verfügung standen. Bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm wurden selektiv Schwingungen von  $\beta$ -Carotin angeregt, da sie zur Anregungswellenlänge resonant waren. Somit konnte  $\beta$ -Carotin (**18**), die frühe Trisporsäure-Vorstufe, optimal mit der Resonanz-Raman-Spektroskopie nach Verwendung der Anregungswellenlänge von 488 nm detektiert werden. Das Raman-Spektrum von  $\beta$ -Carotin ist in Abb.27 dargestellt.  $\beta$ -Carotin wurde mit Raman-Spektroskopie in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Pilzhypen durch Referenzvergleich nachgewiesen und lokalisiert. Dabei ergab sich eine Verteilung von Carotinoiden in den gesamten sexuellen Hyphen von *M. mucedo* (siehe Abb.26). Gametangien zeigten eine etwas erhöhte Carotinoidkonzentration in den mittleren, verschmelzenden Abschnitten der Struktur im Vergleich zu den äußeren Suspensoren.

## Ergebnisse

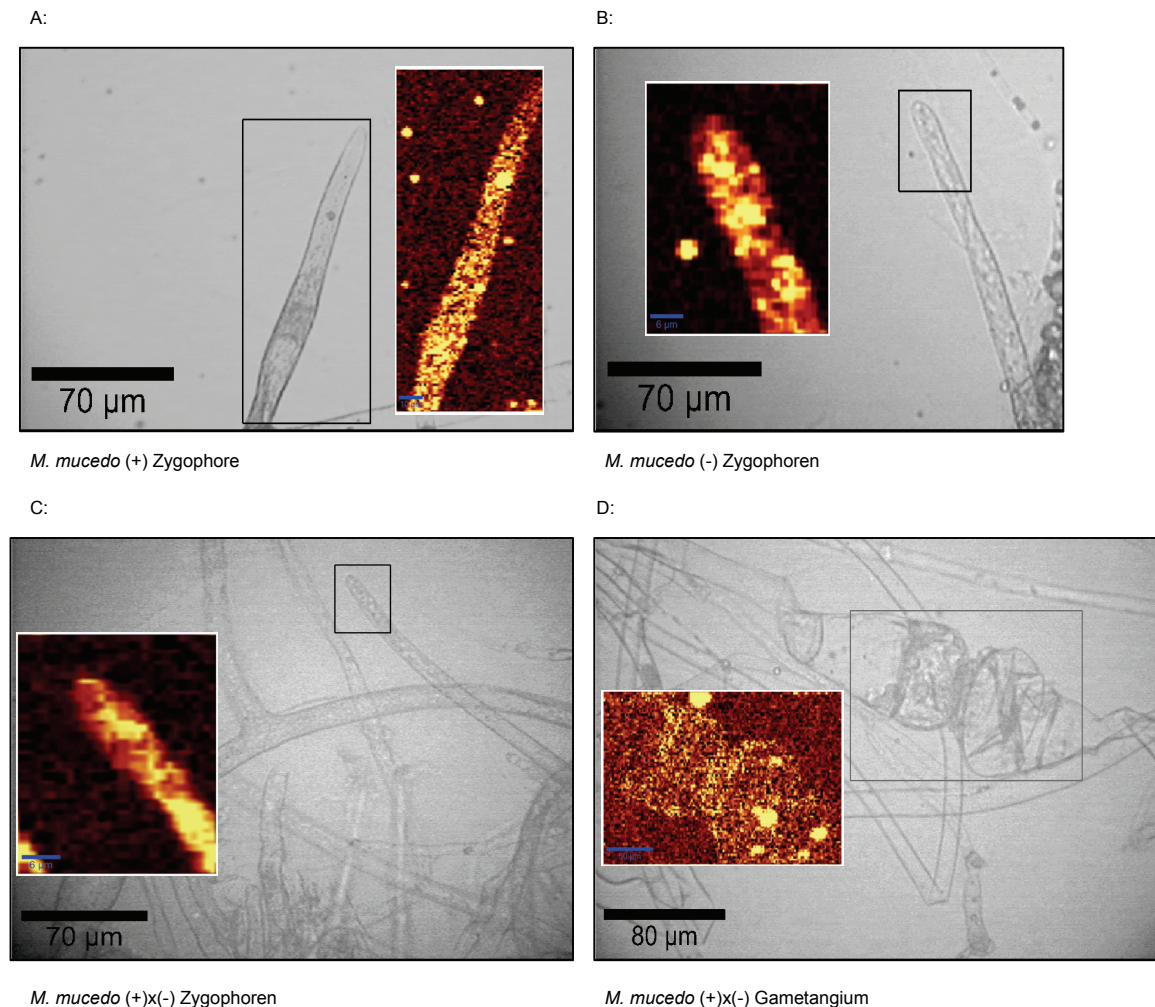


Abb.26: Raman-spektroskopische Karten der Carotinverteilung in *M. mucedo* wurden mittels Resonanz-Raman-Spektroskopie erstellt. Die Lokalisation erfolgte anhand der C=C Doppelbindungen bei einer Wellenzahl von  $1500\text{ cm}^{-1}$ . Eine hell-orange Farbgebung entspricht einer hohen Carotinkonzentration. Die Carotinverteilung in einer Zygophore einer Trisporsäure-stimulierten *M. mucedo* (+) Kultur (A), in einer Trisporsäure-stimulierten *M. mucedo* (-) Kultur (B), in einer Kreuzkultur (C) und in einem Gametangium (D) wurde bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Laserleistung von 0,26 mW gemessen und optisch dargestellt. Eine Verteilung von Carotinoiden in den gesamten sexuellen Hyphen war erkennbar.

Bei Verwendung einer Anregungswellenlänge außerhalb der Absorptionsmaxima von  $\beta$ -Carotin wurden Raman-Messungen durchgeführt, um weitere Verbindungen zu detektieren. Dennoch waren die  $\beta$ -Carotin-Signale bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm sehr dominant. Das Raman-Spektrum von reinem  $\beta$ -Carotin zeigte eine typische C=C Bande bei  $1504\text{ cm}^{-1}$ , CH Bande bei  $1145\text{ cm}^{-1}$  und  $\text{CH}_3$  Bande bei  $997\text{ cm}^{-1}$  (siehe Abb.27).

## Ergebnisse

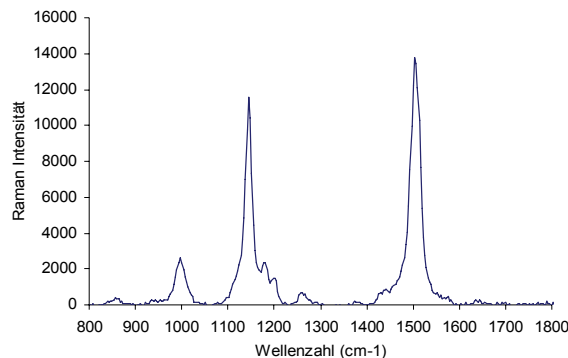


Abb.27: Raman-Spektrum von reinem  $\beta$ -Carotin Standard mit charakteristischer C=C Bande bei  $1504\text{ cm}^{-1}$ , CH Bande bei  $1145\text{ cm}^{-1}$  und  $\text{CH}_3$  Bande bei  $997\text{ cm}^{-1}$ .

Die charakteristische Absorption des C=C Banden-Peaks von  $\beta$ -Carotin diente zur Lokalisation in Pilzhypen. Die Verteilung von Carotinoiden in *M. mucedo* wurde durch den semiquantitativen Nachweis von Verbindungen mit Kohlenstoff-Doppelbindungen bestimmt. Die Wellenzahlen waren durch mögliche Wechselwirkungen z.B. mit Proteinen im Vergleich zum  $\beta$ -Carotin-Standard leicht verschoben. Die Verschiebung der Wellenzahlen befand sich im Toleranzbereich, wie aus Literaturangaben bekannt ist (Schulz *et al.* 2005). Für die C=C Bande ergab sich anstatt  $1504\text{ cm}^{-1}$  ein Wert von  $1523\text{ cm}^{-1}$ . Für die CH Bande ergab sich ein Wert von  $1158\text{ cm}^{-1}$  und für die  $\text{CH}_3$  Bande von  $1004\text{ cm}^{-1}$  (siehe Abb.28).

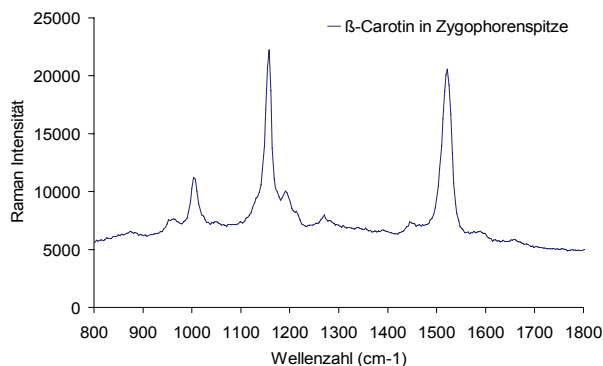


Abb.28: Raman-Spektrum von  $\beta$ -Carotin aus Zygomyceten von *M. mucedo* mit akzeptabel verschobenen Wellenzahlen für die C=C Bande bei  $1523\text{ cm}^{-1}$ , CH Bande bei  $1158\text{ cm}^{-1}$  und  $\text{CH}_3$  Bande bei  $1004\text{ cm}^{-1}$ .

Die zweidimensionalen Mikro-Raman-Messungen erfolgten mit 2-3  $\mu\text{m}$  Tiefenschärfe. Mehrere Strukturen gleicher und unterschiedlicher Entwicklungsstadien wurden gemessen. Eine Messreihe, mit anregendem Laserlicht von 532 nm Wellenlänge, ließ auf eine Verteilung von Carotinoiden in den gesamten asexuellen und sexuellen Hypen von *M. mucedo* schließen (siehe Abb.29) und bestätigte die Ergebnisse der Resonanz-Raman-Spektroskopie. In der gesamten Hyphe war  $\beta$ -Carotin nachweisbar. Bei auskeimenden Sporen und Gametangien war eine höhere Konzentration an Carotinoiden entlang der Zellwand messbar.

## Ergebnisse

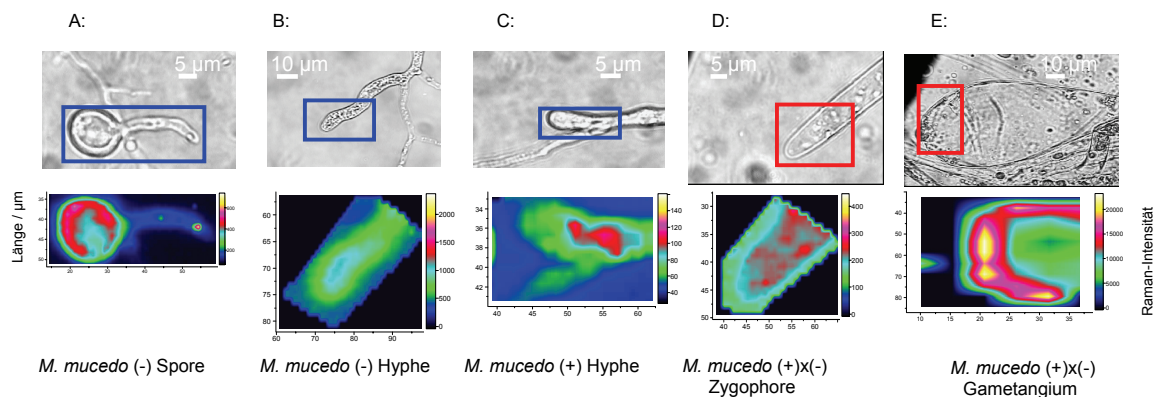


Abb.29: Weitere Raman-spektroskopische Karten der Carotinverteilung in *M. mucedo* bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm bestätigen die Verteilung von  $\beta$ -Carotin in den gesamten asexuellen und sexuellen Hyphenstrukturen. Im Gametangium konzentrierten sich die Carotinoide an der Zellwand der Berührungzone. Die Lokalisation erfolgte anhand der C=C Doppelbindungen bei einer Wellenzahl von  $1500\text{ cm}^{-1}$ . Eine gelbe und pinke Farbgebung entspricht einer hohen Carotinkonzentration, grün und blau einer niedrigen. Die Carotinverteilung in einer auskeimenden Spore einer *M. mucedo* (-) Kultur (A), einer jungen, vegetativen Hyphe einer *M. mucedo* (-) Kultur (B), einer jungen, vegetativen Hyphe einer *M. mucedo* (+) Kultur (C), einer Zygomphore einer *M. mucedo* Kreuzkultur (D) und eines Gametangiums einer *M. mucedo* Kreuzkultur (E) wurde bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm und einer Laserleistung von 10 mW vermessen und optisch dargestellt.

In *Phycomyces blakesleeenanus* wurde  $\beta$ -Carotin als frei fließendes Öl und in Lipoproteinschichten von zentrifugierten Sporangien beobachtet (Cerdá-Olmedo 1987). Aufgrund des lipophilen Charakters von  $\beta$ -Carotin werden die Zellmembran und Lipidglobuli als möglicher Syntheseort genannt (Riley & Bramley 1976, 1982).

Neben dem Vorkommen von  $\beta$ -Carotin in Zellmembranen werden größere Mengen innerhalb der Hyphen gespeichert. In mikroskopischen Aufnahmen war erkennbar, dass sich in älteren Hyphen von *M. mucedo* Tröpfchen konzentrierten (siehe Abb.30). Der Inhalt der Tröpfchen wurde mit Raman-Spektroskopie als  $\beta$ -Carotin identifiziert. Die Carotintröpfchen traten in dieser Form auch aus verletzten Hyphen aus.

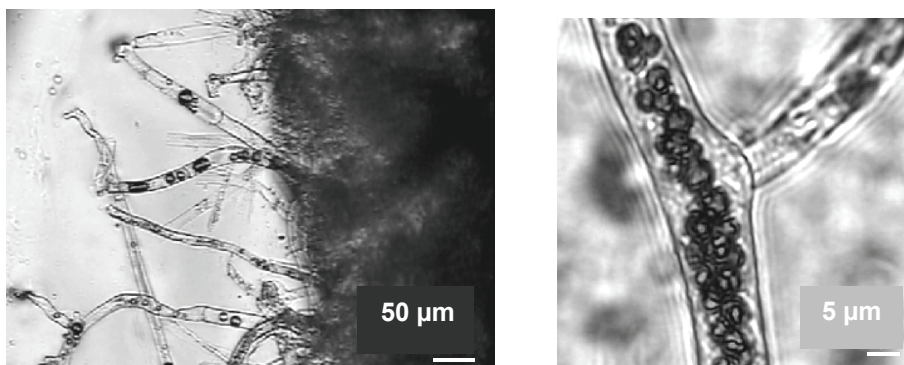


Abb.30: Mikroskopische Aufnahmen von Carotintröpfchen in 10 Tage alten Hyphen von *M. mucedo*.



#### **4.3. Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen Trisporoiden und Carotinproduktion in *Mucor mucedo* und *Blakeslea trispora***

In dieser Arbeit wurde bislang gezeigt, dass in Petrischalenkulturen von *M. mucedo* und *B. trispora* eine Trisporoidproduktion stattfand und folglich  $\beta$ -Carotin als Vorstufe existieren musste. Eine regelmäßige  $\beta$ -Carotinverteilung in asexuellen und sexuellen Hyphen von *M. mucedo* wurde anschließend durch zweidimensionale Mikro-Raman-Spektroskopie nachgewiesen. Aus der Literatur ist bekannt, dass z.B. Trisporinsäure die  $\beta$ -Carotinproduktion in *M. mucedo* stimuliert (Gooday 1968). Um Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu ermitteln, sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Trisporoiden auf den  $\beta$ -Carotin-Stoffwechsel in *M. mucedo* und *B. trispora* quantitativ untersucht werden. Struktur-Wirkungs-Beziehungen sollten anhand quantifizierter Effekte von Trisporoidmolekülen auf die Carotinproduktion aufgestellt werden. Für eine Beurteilung der Aktivität isolierter Trisporoide und synthetischer Trisporoidanaloga wurde ein Biotest zur Carotininduktion im Petrischalensystem mit *M. mucedo* und *B. trispora* entwickelt.

##### **4.3.1. Entwicklung der Kultivierungs-, Extraktions- und Meßmethode für den Biotest zur Carotininduktion**

Die optimalen Extraktions- und Nachweismethoden für  $\beta$ -Carotin wurden experimentell ermittelt. Ein optimales Ergebnis ergab sich, wenn das Myzel gleichmäßig mit Trisporoiden besprüht wurde. Das gesamte behandelte Myzel einer Petrischale wurde geerntet und extrahiert. Das Myzel wurde schockgefroren, um enzymatische Umsetzungsprozesse zu verhindern. Um weiterhin den Abbau von  $\beta$ -Carotin zu verhindern, wurde unter abgedunkelten Bedingungen gearbeitet. Die schnell durchführbare Extraktion fand mit organischem Lösungsmittel statt, da  $\beta$ -Carotin wasserunlöslich ist. Außerdem wurden Abbaureaktionen bzw. mögliche enzymatische Umsetzungen oder Reaktionen mit reaktiven Gruppen aus Proteinen, DNA etc. in der Pilzmatrix vermieden und eine reproduzierbare Quantifizierung von  $\beta$ -Carotin ermöglicht.  $\beta$ -Carotin ist in Trichlormethan gut löslich und extrahierbar. Außerdem ergab sich bei Extraktion mit Trichlormethan eine gute Phasentrennung, so dass Trichlormethan als Extraktionsmittel der Wahl diente. Die organische Phase, die  $\beta$ -Carotin enthielt, wurde direkt mit HPLC analysiert. Durch den Einsatz eines Aceton:Wasser-Gradienten als Laufmittel konnte mit einer Umkehrphasensäule gearbeitet werden. Kalibrierungskurven



## Ergebnisse

wurden mit den Standardsubstanzen  $\beta$ -Carotin (RT = 12,9 min) und  $\beta$ -Carotinal (RT = 10,6 min), für die Berechnung der Carotinmengen in den Pilzproben, erstellt.

Die UV-VIS-Spektren der Carotinvorstufen unterscheiden sich in den Absorptionsmaxima, die für  $\beta$ -Carotin bei 453 nm und 480 nm liegen. Bei den HPLC-Messungen des Carotininduktion-Biotests wurde die Detektionswellenlänge von 453 nm gewählt und damit  $\beta$ -Carotin detektiert und quantifiziert. Die UV-VIS-Spektren der quantifizierten Peaks in den HPLC-Chromatogrammen der Proben zeigten das typische  $\beta$ -Carotin-Spektrum (siehe Abb.31).

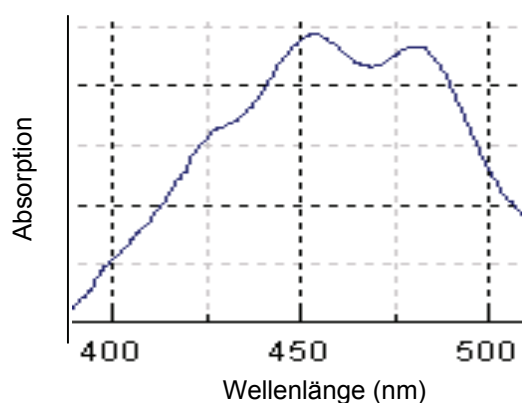


Abb.31: Das UV-VIS-Spektrum von  $\beta$ -Carotin in Aceton zeigt eine Schulter bei 426 nm und einen charakteristischen Peak bei 453 nm und 480 nm.

### 4.3.2. Carotinproduktion in Petrischalenkulturen

Schon aufgrund der gelb-orangen Farbe des Myzels im Petrischalensystem konnte angenommen werden, dass *M. mucedo* Kreuzkulturen messbare Carotinkonzentrationen bilden (siehe Abb.32).

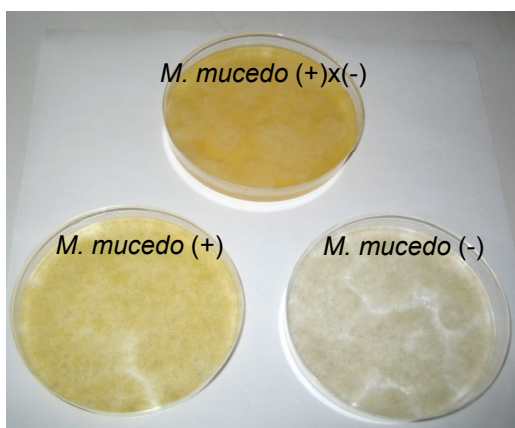


Abb.32: Farbliche Unterschiede der Petrischalenkulturen von *M. mucedo* Einzel- und Kreuzkulturen nach 52 h Inkubation deuten auf einen unterschiedlichen Carotingehalt hin.

## Ergebnisse

Im HPLC-System wurden die akkumulierten Carotinmengen quantifiziert und ein Anstieg der Carotinproduktion über die Zeit in Kreuzkulturen, aber nicht in Einzelkulturen festgestellt (siehe Abb.33). *M. mucedo* (+) und (-) produzierten konstante Carotinmengen über einen Zeitraum von 52 h nach einer Sporenkeimzeit von 90 h. Dabei zeigte *M. mucedo* (-) eine geringere Carotinproduktion (0,17 µg/g FG) als *M. mucedo* (+) (1,76 µg/g FG). Die Carotinproduktion in Kreuzkulturen nahm nach 24 h stärker zu. Möglicherweise setzte ab 24 h die stimulierende Wirkung der Trisporoide, die in *M. mucedo* Kreuzkulturen gebildet werden auf dem Level der Carotinproduktion ein. Bei einer Inkubation von 52 h erreichte die Kreuzkultur die 8-fache Carotinmenge im Vergleich zur (-) Kultur und die 4-fache Carotinmenge im Vergleich zur (+) Kultur.

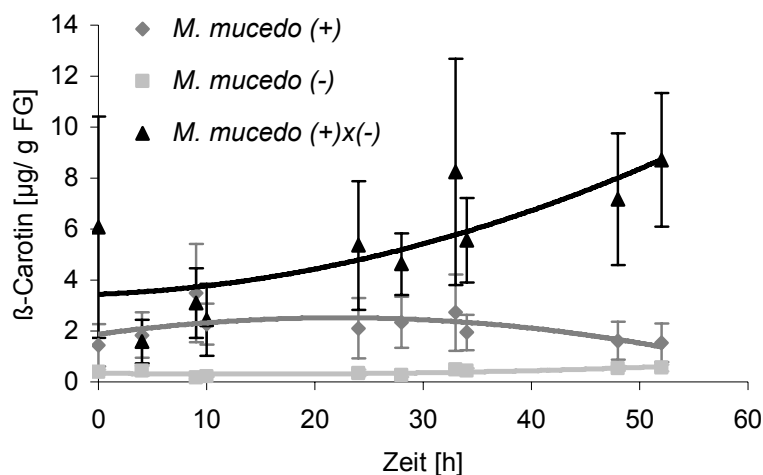


Abb.33: Die Kinetik der Carotinproduktion in *M. mucedo* zeigte einen gleich bleibenden Carotingehalt in Einzel- und einen steigenden Carotingehalt in Kreuzkulturen mit steigenden Inkubationszeiten. Die Angabe 0 h entspricht der Sporenkeimzeit von 90 h. Nach dieser Zeit war ausreichend Pilzmyzel für eine Carotin-Analyse vorhanden. (n=5)

Die Petrischalenkulturen von *B. trispora* zeigten farblich ein ähnliches Bild, wie die *M. mucedo* Kulturen (siehe Abb.34). Beide Organismen eigneten sich aufgrund ihrer induzierbaren Carotinproduktion, optimal für einen Biotest zur Carotininduktion.

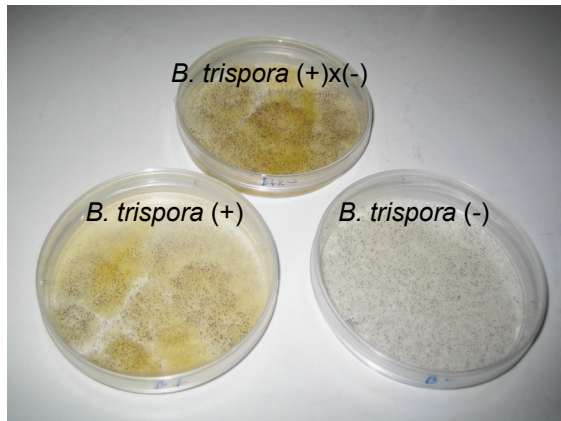


Abb.34: Farbliche Unterschiede der Petrischalenkulturen von *B. trispora* nach 52 h Inkubation ähneln denen von *M. mucedo* und deuten auf einen unterschiedlichen Carotingehalt hin.

### 4.3.3. Trisporsäure B induziert die Carotinproduktion in *Mucor mucedo* und *Blakeslea trispora*

Der Einfluss des Sexualhormons Trisporsäure auf die  $\beta$ -Carotinproduktion sollte untersucht werden. Zuerst wurde die Trisporsäuremenge ermittelt, die zum Erreichen stabiler Carotinwerte nötig war. 14  $\mu\text{g}$  Trisporsäure B (**14**) pro Platte erzeugten nach einer Inkubationszeit von 44 h und Sporenkeimzeit von 90 h einen eindeutigen Effekt bei *M. mucedo* (-) Kulturen (siehe Abb.35 A). Der Carotingehalt von mit 14  $\mu\text{g}$  Trisporsäure B (**14**) behandelten *M. mucedo* (-) Kulturen war halb so hoch (1,93  $\mu\text{g/g}$  FG), wie der Sättigungswert bei Behandlung mit 56  $\mu\text{g}$  Trisporsäure B (**14**) (3,57  $\mu\text{g/g}$  FG), aber noch ausreichend für einen eindeutigen Effekt. Für *M. mucedo* war der Carotingehalt, der mit 14  $\mu\text{g}$  Trisporsäure B (**14**) behandelten Kulturen signifikant höher als der Carotingehalt für die Kontrolle (**1**) (*M. mucedo* (+): 1,90  $\mu\text{g/g}$  FG bei Trisporsäure B-Gabe, 0,74  $\mu\text{g/g}$  FG in Kontrolle:  $P = 0,02$ ; *M. mucedo* (-): 1,94  $\mu\text{g/g}$  FG bei Trisporsäure B-Gabe, 0,59  $\mu\text{g/g}$  FG in Kontrolle:  $P = 0,03$ ). Für *B. trispora* war für den (-) Kreuzungstyp ein signifikanter Unterschied messbar (*B. trispora* (+): 3,23  $\mu\text{g/g}$  FG bei Trisporsäure B-Gabe, 3,40  $\mu\text{g/g}$  FG in Kontrolle:  $P = 1,00$ ; *B. trispora* (-): 0,69  $\mu\text{g/g}$  FG bei Trisporsäure B-Gabe, 0,39  $\mu\text{g/g}$  FG in Kontrolle:  $P = 0,04$ ).

Bei *B. trispora* war nach Behandlung mit 7, 14, 28 und 56  $\mu\text{g/Platte}$  Trisporsäure B (**14**) kein deutlicher Anstieg der Carotinproduktion erkennbar (siehe Abb.35 B), so dass die optimale Behandlungsmenge für folgende Untersuchungen aus der Wirkungskurve von *M. mucedo* (siehe Abb.35 A) ermittelt wurde. Bei allen Kulturen der folgenden Experimente wurden 14  $\mu\text{g}$  Trisporsäure B (**14**) pro Platte eingesetzt, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den beiden Kreuzungstypen und Arten zu ermöglichen. Im folgenden Biotest zur Carotininduktion wurde somit nur ein Parameter,

## Ergebnisse

nämlich die Substanz, verändert. Die Frischgewichte (FG) der *M. mucedo* Kulturen betrugen 505 +/- 90 mg pro Platte und in *B. trispora* Kulturen 645 +/- 90 mg pro Platte.

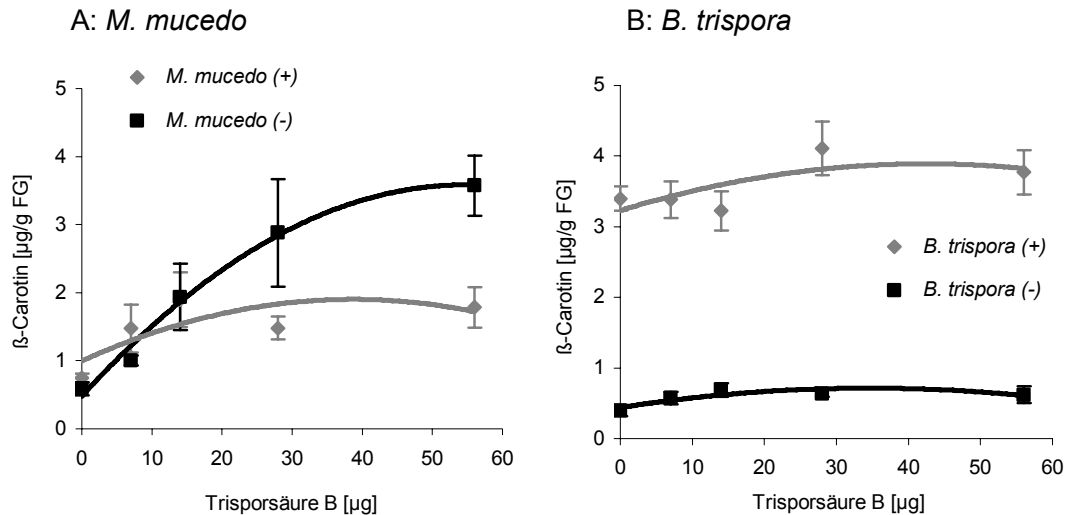


Abb.35: Die Carotin-Aktivitätskurven in Abhängigkeit zur Trisporaensäure B Konzentration bei *M. mucedo* (A) und *B. trispora* (B) nach einer Sporenkeimzeit von 90 h und anschließender Inkubation mit Trisporaensäure B (14) für 44 h zeigten einen deutlichen Anstieg der Carotinproduktion in *M. mucedo* (-). Der Carotingehalt bei 0 µg/Platte Trisporaensäure B (14) entspricht der Ethanolkontrolle. (n=5)

Weiterhin wurden Kinetiken zur Wirkung von Trisporaensäure B (14) auf *M. mucedo* und *B. trispora* bestimmt. Bei allen Kulturen war nach einer Sporenkeimzeit von 90 h und 44 h Inkubation mit Trisporaensäure B (14) ein mehr oder weniger erhöhter, stationärer Level erreicht. Der (+) Kreuzungstyp von *M. mucedo* zeigte einen geringen Anstieg der Carotinproduktion nach 33 h im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb.36 A). Der (-) Kreuzungstyp zeigte schon einen Anstieg nach 5 h und erreichte das Maximum nach 20 h Inkubation (siehe Abb.36 B). Der größte Effekt war in *M. mucedo* (-) nach 20 h Inkubation messbar, aber mit einem größeren Fehlerbalken als nach 44 h, wo ebenfalls ein starker Effekt messbar und das stationäre Gleichgewicht erreicht war. Nach 44 h Inkubation wurden bei *M. mucedo* (+) 73 % der Maximalaktivität gemessen, bei *M. mucedo* (-) 66 % (siehe Abb.36 A, B), bei *B. trispora* (+) 79 % und *B. trispora* (-) 56 % (siehe Abb.36 C, D). Eine Inkubationszeit von 44 h nach einer Sporenkeimzeit von 90 h wurde für weitere Experimente gewählt, weil dadurch gleiche Bedingungen für eine Vergleichbarkeit der Daten geschaffen wurden.

## Ergebnisse

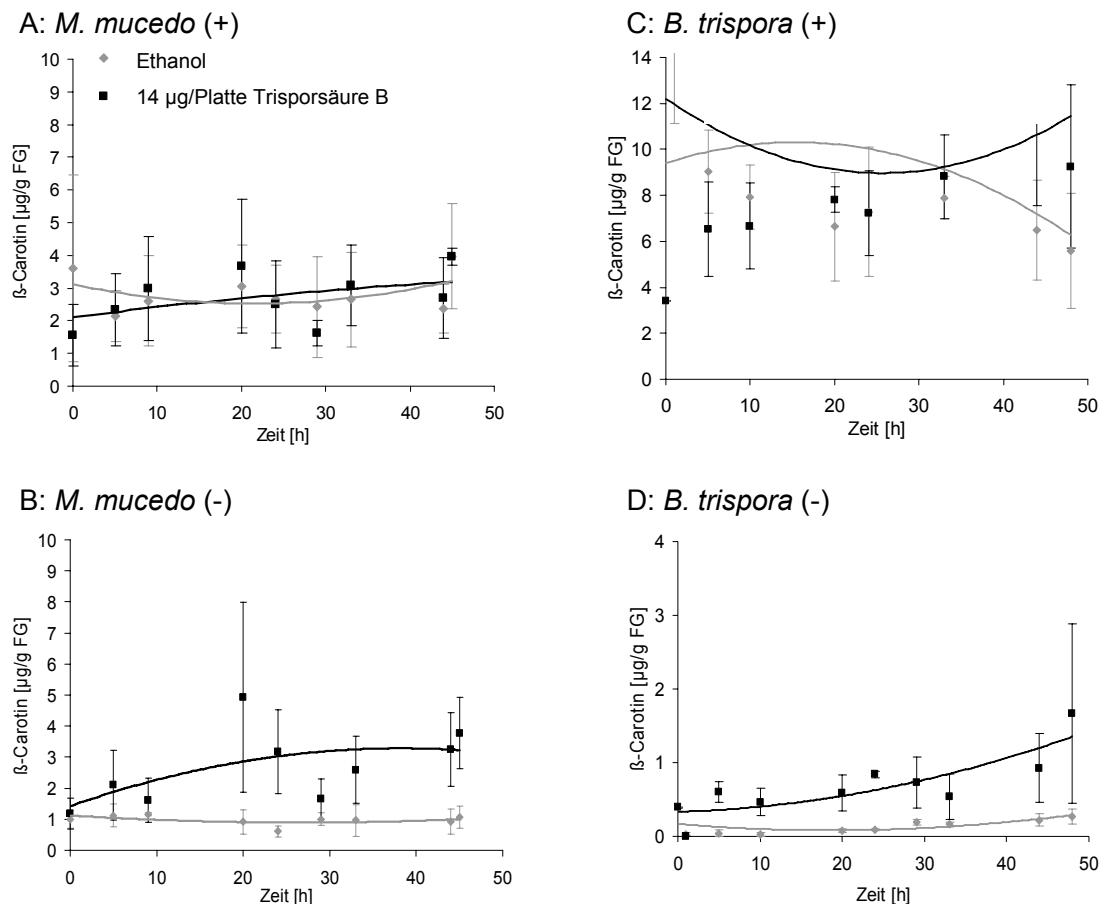


Abb.36: Die Carotin-Kinetiken von *M. mucedo* (A, B) und *B. trispora* (C, D) nach Trisporsäure B-Behandlung zeigten einen Carotin-induzierenden Effekt in den (-) Kreuzungstypen nach 24 h Inkubation. (n=3)

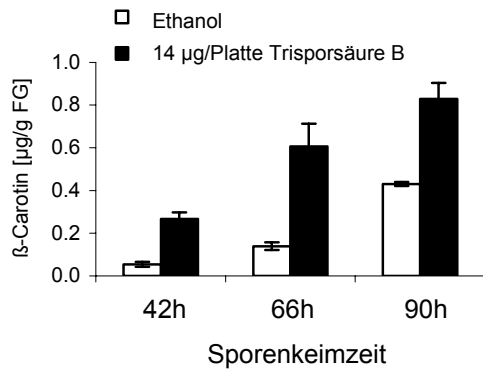
Zur Überprüfung, ob Pilzkulturen aus 90 h lang gekeimten Sporen die deutlichsten Unterschiede in der Carotinproduktion zwischen Kontrolle und stimulierter Pilzkultur ergaben, wurden unterschiedliche Sporenkeimzeiten getestet. Zu junge Kulturen würden zu wenig Myzelmaterial liefern und zu alte Kulturen könnten hinsichtlich der Carotinproduktion nicht mehr stimulierbar sein.

Nach einer Sporenkeimzeit von 42 h und 66 h und anschließender Inkubation von 44 h mit Trisporsäure B (**14**) bildeten *M. mucedo* Einzelkulturen niedrigere Carotinmengen pro Frischgewicht als Kulturen mit 90 h Sporenkeimzeit (siehe Abb.37 A, B). Die Carotinmengen nach 90 h Sporenkeimzeit waren zwischen Kontrollen (**1**) und Trisporsäure B (**14**) behandelten Kulturen für *M. mucedo* (+) signifikant unterschiedlich (0,83  $\mu\text{g/g FG}$  bei Trisporsäure B-Gabe, 0,43  $\mu\text{g/g FG}$  in Kontrolle:  $P = 0,02$ ), ebenso für *M. mucedo* (-) (0,85  $\mu\text{g/g FG}$  bei Trisporsäure B-Gabe, 0,17  $\mu\text{g/g FG}$  in Kontrolle:  $P = 0,04$ ) (siehe Abb.37 A, B) und *B. trispora* (-) (3,48  $\mu\text{g/g FG}$  bei Trisporsäure B-Gabe,

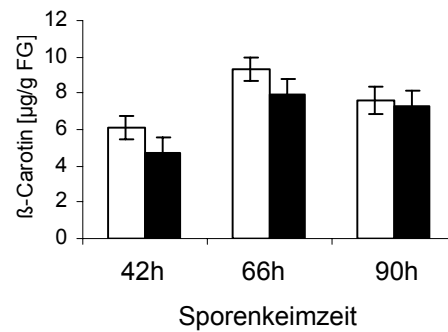
## Ergebnisse

2,25 µg/g FG in Kontrolle: P = 0,07) (siehe Abb.37 C, D). Die Sporenkeimzeit von 90 h wurde für die folgenden Untersuchungen als optimal ausgewählt.

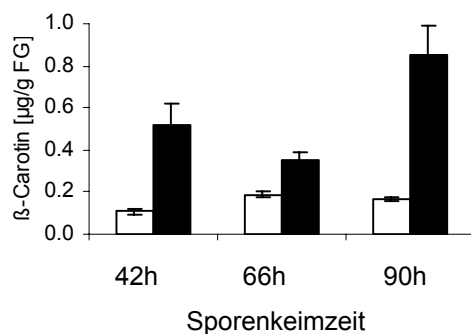
A: *M. mucedo* (+)



C: *B. trispora* (+)



B: *M. mucedo* (-)



D: *B. trispora* (-)

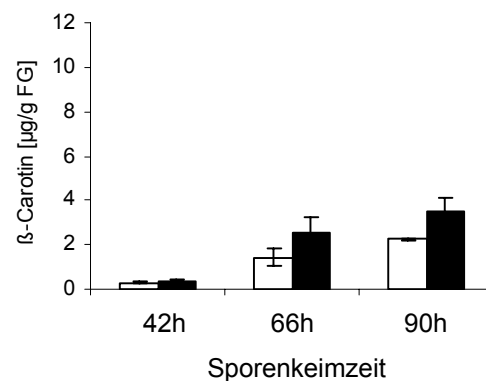


Abb.37: Ermittlung der optimalen Sporenkeimzeit für den Biotest zur Carotininduktion. Das optimale Alter der auskeimenden Sporen von *M. mucedo* (A, B) und *B. trispora* (C, D) nach Behandlung mit Trisporsäure B für 44 h betrug 90 h, da dann die höchsten Carotinproduktionen erreicht wurden. (n=5)

### 4.3.4. Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen Trisporoidanaloga und Carotinsynthese in *Mucor mucedo* und *Blakeslea trispora*

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von Strukturelementen von Trisporoid-Verbindungen quantitativ zu bestimmen. Für diesen Zweck wurde der neu entwickelte Biotest zur Carotininduktion verwendet. Die Wirkung von 20 Trisporoid-artigen Verbindungen (siehe Abb.14) auf die Carotin-Biosynthese in *M. mucedo* und *B. trispora* wurden ermittelt. Dabei wurde die Fähigkeit der Verbindungen, die Carotinproduktion zu induzieren getestet. Dazu wurden 90 h lang gekeimte Pilzsporen nach Behandlung mit 14 µg/Platte Trisporoidlösung 44 h inkubiert, anschließend extrahiert und per HPLC/DAD vermessen. Als Kontrolle diente A. dest. mit 20 % Ethanol.

## Ergebnisse

Die Verbindungen mit den größten Wirkungen werden nachfolgend beschrieben. Verbindung **14** induzierte in *M. mucedo* (-) einen 15-fach höheren Carotingehalt als die Lösungsmittel-Kontrolle (**1**) und zeigte somit die größte Wirkung in *M. mucedo* (-) (siehe Abb.38 A). Verbindung **15** induzierte in *M. mucedo* (+) einen 2-fach höheren Carotingehalt als die Kontrolle (**1**). Verbindung **8** induzierte in *B. trispora* (-) einen 23-fach höheren Carotingehalt als die Kontrolle (**1**) (siehe Abb.38 B). Verbindung **12** induzierte in *B. trispora* (+) einen 1,5-fach höheren Carotingehalt als die Kontrolle.

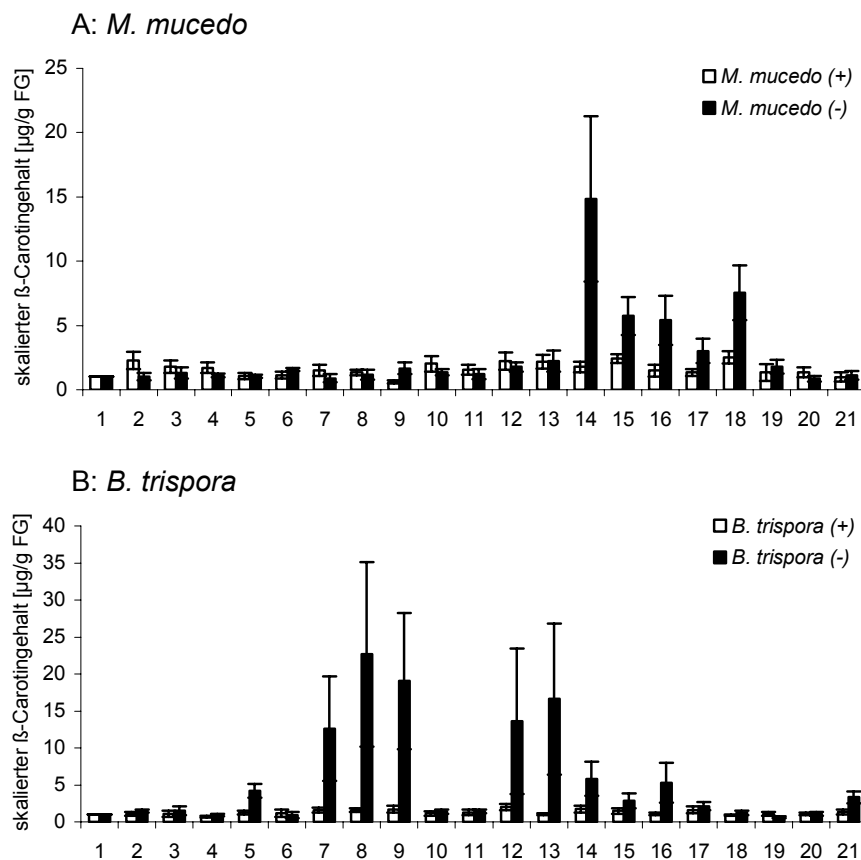


Abb.38: Biotest zur Carotininduktion. Darstellung der skalierten Carotingehalte der Einzelkulturen von *M. mucedo* (A) und *B. trispora* (B) nach Behandlung mit 20 verschiedenen Trisporoid-ähnlichen Verbindungen (14  $\mu\text{g/Platte}$ ). (n=5, Standardfehler) Legende der Verbindungen 1-21 siehe Abb.14

Um eine eindeutige Aktivitätsreihenfolge aller 20 Testverbindungen festzulegen, wurden Aktivitätswerte errechnet. Dazu wurde von der skalierten Carotinmenge in  $\mu\text{g/g}$  FG der Standardfehler subtrahiert. Eine Aktivität lag vor, wenn sich ein Aktivitätswert von über 1,00 ergab, da die Ethanolkontrolle als 1,00 festgesetzt wurde. Der Aktivitätswert

## Ergebnisse

beschreibt den Minimalwert als die untere Grenze der Aktivierungsfähigkeit einer Verbindung. Falsch positive Werte wurden somit ausgeschlossen. In Tab.3 werden die Aktivitätswerte aller Carotin-induzierenden Verbindungen dargestellt. Die Tab.3 zeigt ebenfalls, dass mit einigen Testsubstanzen eine signifikante Erhöhung des  $\beta$ -Carotiningehalts induziert wurde, d.h. die P-Werte liegen unter 0,05.

Tab.3: Carotin-induzierende Verbindungen wurden nach abnehmender Aktivität aufgelistet. Carotin-induzierende Verbindungen mit einem Aktivitätswert (A = skaliertes Carotiningehalt - Standardfehler) über 1,00 erhöhten die  $\beta$ -Carotin-Biosynthese in *M. mucedo* und *B. trispora* signifikant bei  $P \leq 0.05$  (n.s. = nicht signifikant). Legende der Verbindungen siehe Abb.14

	Verbindung	Aktivitätswerte A	Signifikanzen P
<b><i>M. mucedo</i> (+)</b>	<b>15</b>	2.09	0.003
	<b>18</b>	2.03	0.050
	<b>13</b>	1.67	0.003
	<b>2</b>	1.61	0.027
	<b>12</b>	1.54	n.s.
	<b>10</b>	1.42	n.s.
	<b>14</b>	1.37	n.s.
	<b>3</b>	1.29	n.s.
	<b>4</b>	1.29	0.049
	<b>11</b>	1.15	n.s.
	<b>8</b>	1.13	n.s.
	<b>7</b>	1.05	n.s.
	<b>17</b>	1.05	n.s.
	<b>16</b>	1.03	n.s.
<b><i>M. mucedo</i> (-)</b>	<b>14</b>	8.43	0.005
	<b>18</b>	5.41	0.004
	<b>15</b>	4.26	0.007
	<b>16</b>	3.48	0.046
	<b>17</b>	2.06	n.s.
	<b>6</b>	1.43	0.029
	<b>12</b>	1.42	n.s.
	<b>13</b>	1.40	0.021
	<b>19</b>	1.28	n.s.
	<b>9</b>	1.20	n.s.
	<b>10</b>	1.11	n.s.
<b><i>B. trispora</i> (+)</b>	<b>12</b>	1.60	n.s.
	<b>8</b>	1.35	n.s.
	<b>14</b>	1.29	n.s.
	<b>9</b>	1.24	n.s.
	<b>7</b>	1.22	n.s.
	<b>17</b>	1.18	n.s.
	<b>15</b>	1.10	n.s.
	<b>21</b>	1.02	n.s.



Tab.3: Fortsetzung

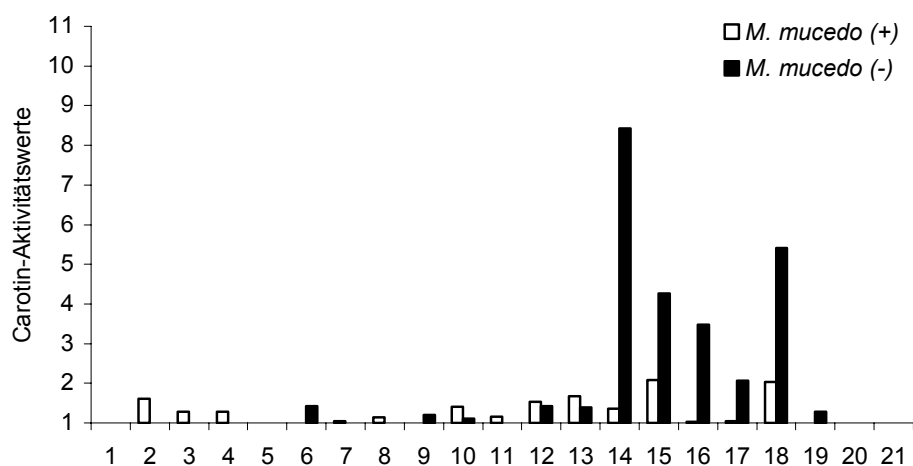
	Verbindung	Aktivitätswerte A	Signifikanzen P
<b><i>B. trispora</i> (-)</b>	<b>8</b>	10.18	0.006
	<b>9</b>	9.85	0.0002
	<b>13</b>	6.36	n.s.
	<b>7</b>	5.52	0.004
	<b>12</b>	3.78	n.s.
	<b>14</b>	3.49	n.s.
	<b>5</b>	3.24	0.014
	<b>16</b>	2.63	0.044
	<b>21</b>	2.53	n.s.
	<b>15</b>	1.83	n.s.
	<b>17</b>	1.58	0.015
	<b>2</b>	1.26	n.s.
	<b>11</b>	1.16	n.s.
	<b>10</b>	1.08	n.s.

Zusätzlich dient die Abb.39 dem optischen Vergleich der Aktivitätswerte, die aus den Werten der Tab.3 resultieren. Die Grafik macht deutlich, dass vorwiegend der (-) Kreuzungstyp zur Carotinproduktion stimuliert wurde und unterschiedliche Verbindungen in den beiden Zygomyceten-Arten wirksam waren.

Die Strukturformeln aller aktiven Verbindungen sind in Abb.40A und B dargesellt. Verbindungen, die ausschließlich in einem der beiden Kreuzungstypen wirkten, sind farbig unterlegt.

## Ergebnisse

### A: *M. mucedo*



### B: *B. trispora*

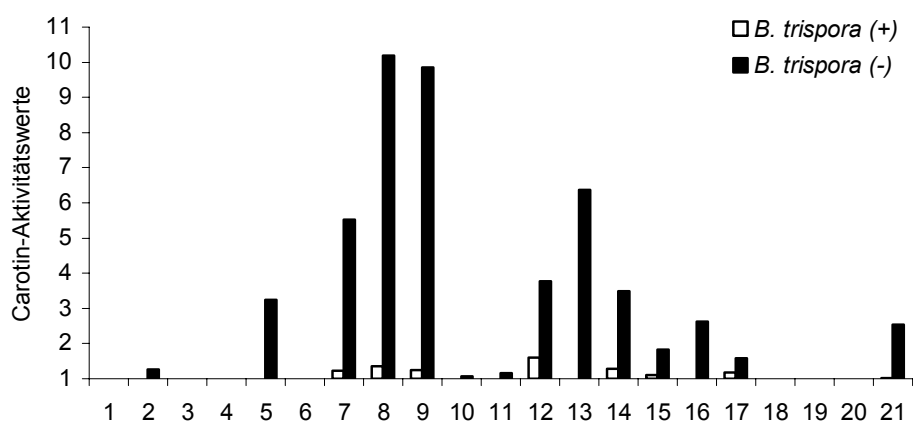
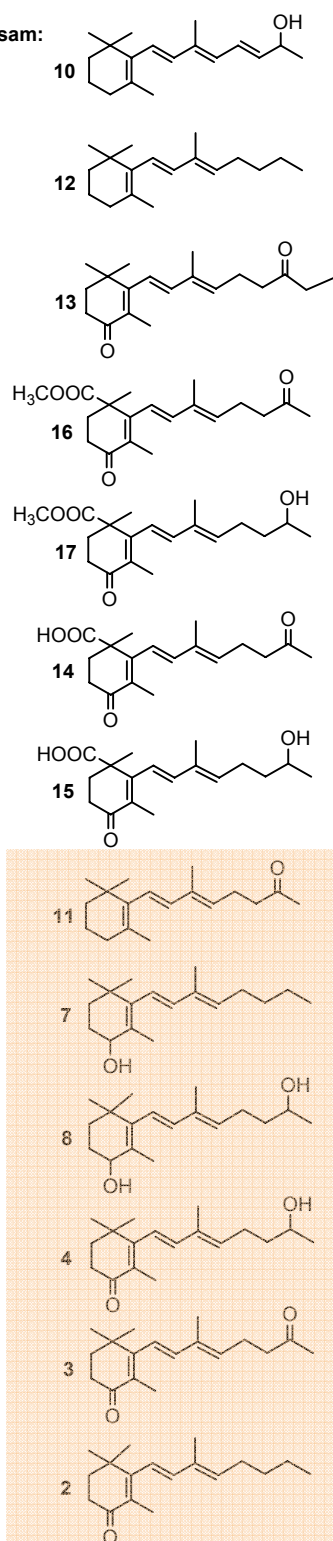


Abb.39: Zur Tab.3 ergänzende Aktivitätswert-Darstellung des Biotests zur Carotininduktion. Die Carotininduktion in *M. mucedo* (A) und *B. trispora* (B) nach Trisporoidbehandlung (14 µg/Platte) wird dargestellt durch errechnete Aktivitätswerte (A = skaliertes Carotiningehalt - Standardfehler). Legende der Verbindungen 1-21 siehe Abb.14

## Ergebnisse

im (+) Typ wirksam:



im (-) Typ wirksam:

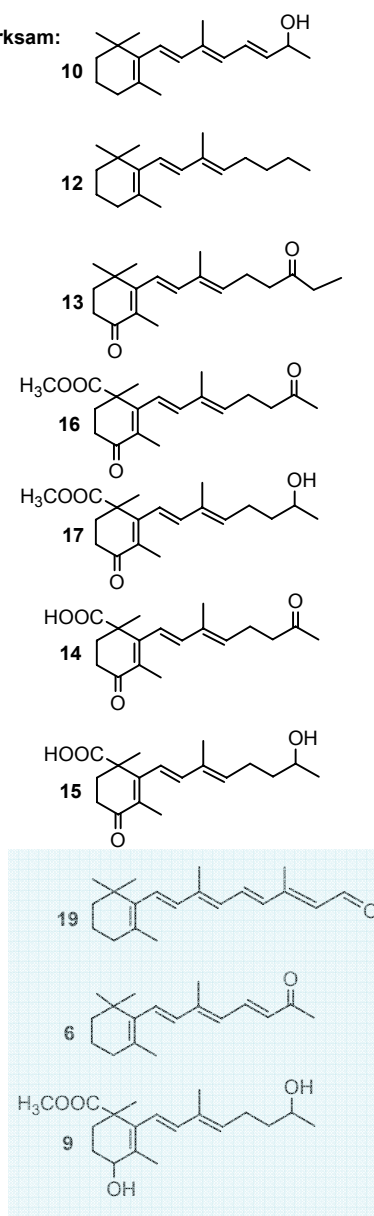
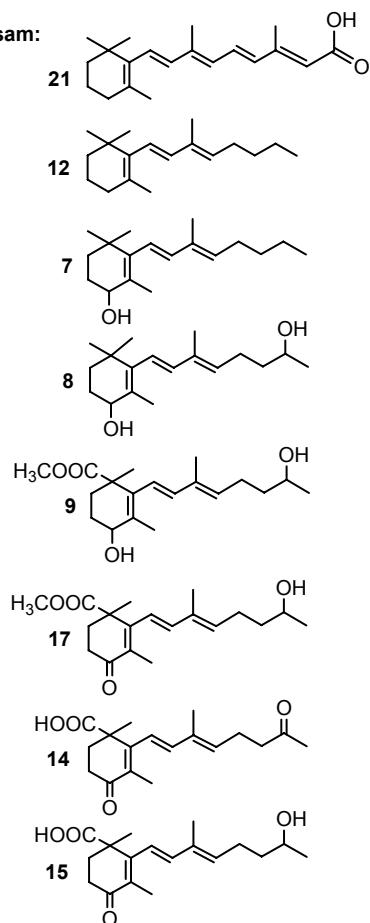


Abb.40 A: Alle Carotin-induzierenden Trisporoid-Verbindungen wurden nach Kreuzungstyp-abhängiger Wirkung in *M. mucedo* aufgelistet. orange = ausschließlich im (+) Typ wirksame Verbindungen, blau = ausschließlich im (-) Typ wirksame Verbindungen.

## Ergebnisse

im (+) Typ wirksam:



im (-) Typ wirksam:

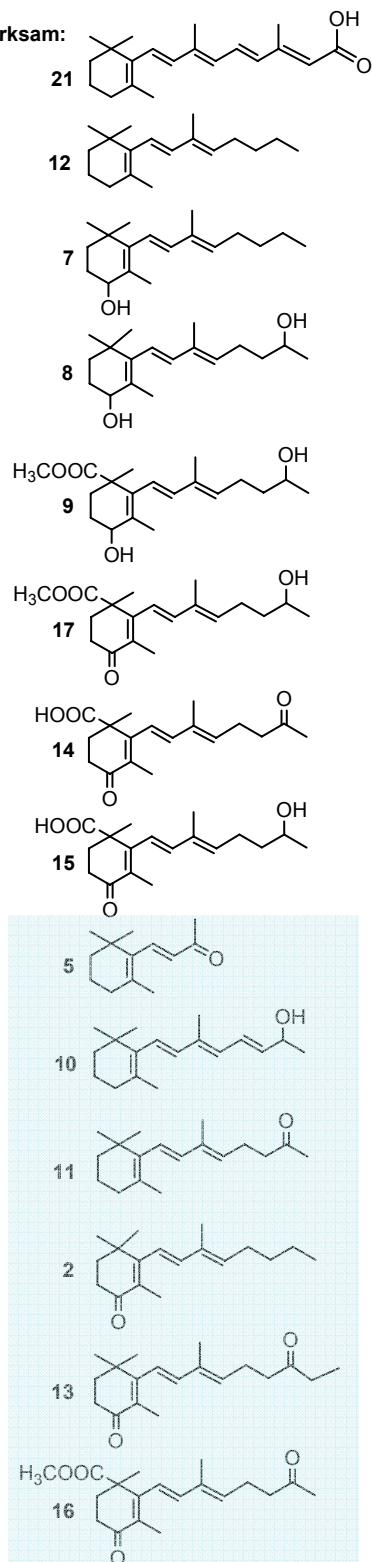


Abb.40 B: Alle Carotin-induzierenden Trisporoid-Verbindungen wurden nach Kreuzungstyp-abhängiger Wirkung in *B. trispora* aufgelistet. blau = ausschließlich im (-) Typ wirksame Verbindungen.

Durch den Vergleich von skalierten Carotinmengen und berechneten Aktivitätswerten wurde offensichtlich, dass die Verbindungen **14**, **15**, **16** und **17** Carotin-induzierende Wirkung in *M. mucedo* (-) zeigten (siehe Tab.3, Abb.39, 40A). Außerdem wurde bestätigt, dass Verbindung **14** die stärkste induzierende Fähigkeit besaß, gefolgt von Verbindung **15** mit einer halb so starken Wirksamkeit ( $A(15) = 4,2$ ;  $A(14) = 8,4$ ). Die Verbindungen **6**, **9**, **10**, **12**, **13** und **19** überstiegen den Schwellenwert von 1,00 im (-) Typ nur minimal. Die Verbindungen **6**, **9** und **19** induzierten ausschließlich im (-) Typ die Carotinproduktion. Die Verbindungen **2**, **3**, **4**, **7**, **8** und **11** waren ausschließlich im (+) Typ wirksam. Die Verbindungen **10**, **12**, **13**, **14**, **15**, **16** und **17** waren in beiden Kreuzungstypen Carotin-induzierend wirksam.

Die Verbindungen **2**, **5**, **7-17** und **21** zeigten Carotin-induzierende Wirkung in *B. trispora* (-) (siehe Tab.3, Abb. 39, 40B). Dabei waren Verbindung **8** und **9** am aktivsten ( $A(8) = 10,1$ ;  $A(9) = 9,8$ ). Alle in *B. trispora* (+) wirksamen Verbindungen (**7**, **8**, **9**, **12**, **14**, **15** und **17**) überstiegen den Schwellenwert von 1,00 nur minimal. Die Verbindungen **2**, **5**, **10**, **11**, **13** und **16** waren ausschließlich im (-) Typ aktiv. In *B. trispora* fanden sich keine ausschließlich (+) wirksamen Verbindungen. Die Verbindungen **7**, **8**, **9**, **12**, **15**, **17** und **21** waren in beiden Kreuzungstypen aktiv.

Die Effekte in den (+) Kreuzungstypen der beiden untersuchten Arten waren insgesamt geringer, als in den (-) Typen, bei denen deutliche Aktivitätsunterschiede nach Applikation der verschiedenen Testsubstanzen erkennbar waren.

Verbindungen mit dem Kohlenstoffgerüst von Trisporoiden aus einem C<sub>6</sub>-Ring und einer C<sub>8</sub>-Seitenkette mit 2 Doppelbindungen zeigten induzierende Wirkung auf die  $\beta$ -Carotinproduktion. Die Carboxylgruppe am C(1) des Kohlenstoffrings erhöhte die Bioaktivität in beiden Kreuzungstypen von *M. mucedo* deutlich. Trisporsäure C (**15**) mit der Carboxylgruppe am C(1) und der Hydroxylgruppe am C(13) der Seitenkette war in *M. mucedo* (+) aktiver als Trisporsäure B (**14**). Trisporsäure B (**14**) mit der Carboxylgruppe am C(1) und der Ketogruppe am C(13) der Seitenkette war die aktivste Verbindung in *M. mucedo* (-). Die in *M. mucedo* (-) Carotin-induzierenden Verbindungen **6**, **10** und **19** enthielten eine zusätzliche Doppelbindungen in der Seitenkette. Die Verbindung **10** war ebenfalls in *M. mucedo* (+) und *B. trispora* (-) aktiv. Die aufsteigende Aktivität von Verbindung **17** zu **16** über **15** zu **14** wurde in *M. mucedo* (-) deutlich sichtbar. Die Kombination aus Hydroxylgruppe an der Seitenkette und Estergruppe am Ring der C-Form induzierte weniger stark als die B-Form mit einer Ketogruppe am C(13). Die Kombination aus Ketogruppe an der Seitenkette und Carboxylgruppe am

Ring, wie bei der Verbindung **14**, war am aktivsten. Die meisten in *M. mucedo* Carotin-induzierenden Verbindungen enthielten eine Ketogruppe am C(4) des Kohlenstoffrings. Die am stärksten Carotin-induzierenden Verbindungen in *B. trispora* enthielten eine Hydroxylgruppe am C(4) des Rings. Trisporsäure B (**14**) mit der Carboxylgruppe am C(1) und der Ketogruppe am C(13) der Seitenkette war sowohl in *B. trispora* (+) als auch in *B. trispora* (-) aktiver als Trisporsäure C (**15**). Auffällig war, dass die synthetischen Verbindungen **12** und **13** sowie Verbindung **7**, mit wenigen funktionellen Gruppen am Molekül, eine deutliche Erhöhung der Carotinproduktion bewirkten, die etwa halb so stark war, wie die durch Verbindung **8** ausgelöste stärkste Reaktion. Die Verbindungen **12**, **14**, **15**, **17** induzierten in beiden Kreuzungstypen beider Arten die Carotinproduktion und können als generell aktivierende Verbindungen charakterisiert werden.

Die Effekte von Trisporoiden auf die Carotinproduktion waren eindeutig messbar. Aber um einen Effekt von  $\beta$ -Carotin (**18**) auf die Carotinproduktion zu bestimmen, wurde vorerst die Wiederfindung von extern zugegebenem  $\beta$ -Carotin ermittelt. Dazu wurde  $\beta$ -Carotin in drei definierten Mengen auf das Pilzmyzel aufgetragen und sofort extrahiert. Die Wiederfindung des extern zugegebenen  $\beta$ -Carotins betrug 100 % für 0,025  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   $\beta$ -Carotin, 108 % für 0,038  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   $\beta$ -Carotin und 101 % für 0,050  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   $\beta$ -Carotin bei *M. mucedo* (+) bzw. 105 % für 0,025  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   $\beta$ -Carotin, 92 % für 0,038  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   $\beta$ -Carotin und 97 % für 0,050  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   $\beta$ -Carotin bei *M. mucedo* (-). Die Wiederfindung betrug 89 % für 0,025  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   $\beta$ -Carotin, 85 % für 0,038  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   $\beta$ -Carotin und 91 % für 0,050  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   $\beta$ -Carotin bei *B. trispora* (+) bzw. 95 % für 0,025  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   $\beta$ -Carotin, 96 % für 0,038  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   $\beta$ -Carotin und 96 % für 0,050  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   $\beta$ -Carotin bei *B. trispora* (-). Die Angaben resultieren aus Mittelwerten von 4 Wiederholungen. Das extern zugegebene  $\beta$ -Carotin wurde demzufolge mit der Methode der Trichlormethanextraktion im Ultraschallbad vollständig extrahiert. Bei Zugabe von 14  $\mu\text{g}/\text{Platte}$   $\beta$ -Carotin verursachte  $\beta$ -Carotin keinen nachweisbaren Effekt auf das Pilzmyzel nach 44 h Inkubation, da weniger als 14  $\mu\text{g}/\text{Platte}$  extrahierbar waren. Nach 44 h Inkubation waren für *M. mucedo* (-) lediglich 7,2  $\mu\text{g}$ , für *M. mucedo* (+) 2,9  $\mu\text{g}$ , *B. trispora* (-) 1,9  $\mu\text{g}$  und für *B. trispora* (+) 2,6  $\mu\text{g}$  pro Platte nachweisbar.

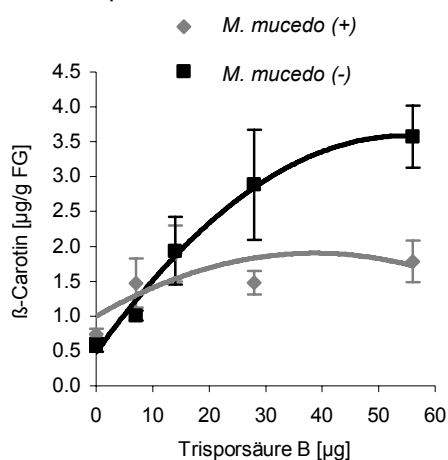
Um Extraktionsschwankungen aus den Werten auszuschließen, wurde der interne Standard  $\beta$ -Carotinal zugesetzt und das Verhältnis zwischen extrahierter  $\beta$ -Carotin- und  $\beta$ -Carotinalmenge berechnet. Durch den Einsatz des internen Standards  $\beta$ -Carotinal mit definierter Konzentration von 0,01  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  veränderten sich die Wiederfindungsraten nach Berechnung gleichmäßig. Die Wiederfindungsraten waren bei den (+) Kreuzungstypen um 12 % und bei den (-) Kreuzungstypen um 17 % geringer.

Im Biotest zur Carotininduktion wurden alle Verbindungen als eine Mischung aus E/Z Stereoisomeren (1/1) und R/S Enantiomeren (1/1) untersucht. In Trisporoidextrakten verschiedener Zygomyceten wurden Verhältnisse von 1 zu 1 nachgewiesen. Die racemische Mischung im Laborversuch orientiert sich somit an den natürlichen Bedingungen.

### 4.3.5. Einige Trisporoide induzieren gleichzeitig die Carotinproduktion und Zygothorenbildung in *Mucor mucedo*

Eine Korrelation zwischen Carotinproduktion und der Zygothorenbildung war nach Behandlung mit einigen Trisporoid-Verbindungen in *M. mucedo* beobachtbar. Bei Behandlung mit gereinigter Trisporinsäure B (**14**) wurde eine Koinzidenz zwischen Carotinproduktion und Zygothorenbildung beobachtet. Trisporinsäure B (**14**) induzierte mit steigender Konzentration gleichermaßen Zygothorenbildung (persönliche Mitteilung von Christine Schimek) und Carotinproduktion (siehe Abb.41). *M. mucedo* (-) bildete dabei mehr und schneller Zygothoren bzw. Carotin als *M. mucedo* (+).

A: Carotinproduktion



B: Zygothorenbildung

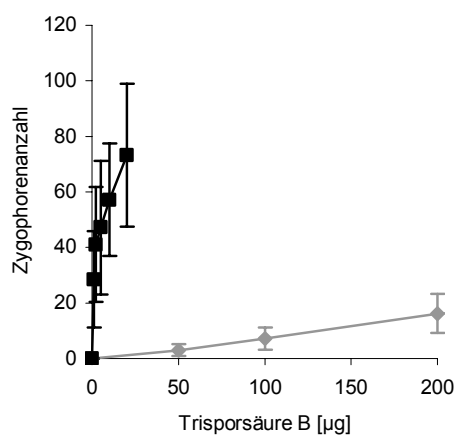


Abb.41: Vergleich der Carotinproduktion und Zygothorenbildung nach Trisporinsäure-Behandlung von *M. mucedo* Petrischalen-Kulturen. Eine Koinzidenz zwischen Carotinproduktion (A) und Zygothorenbildung (B) wurde bei Trisporinsäure B (**14**) Behandlung in *M. mucedo* beobachtet, da in beiden Tests der untersuchte Parameter mit steigender Trisporinsäure B (**14**) Konzentration anstieg, wobei der (-) Kreuzungstyp stärker reagierte.

Bei Applikation von 14 µg/Platte bewirkten die Verbindungen **2**, **3**, **4** und **11** in *M. mucedo* (+) und die Verbindungen **9**, **16** und **17** in *M. mucedo* (-) eine Aktivierung der Carotinproduktion und der Zygothorenbildung (siehe Tab. 4). Die Verbindungen **14** und **15** bewirkten parallel eine Induktion beider Antworten in beiden Kreuzungstypen. Die

## Ergebnisse

Verbindungen **14** und **15** waren demnach bei beiden Antworten Kreuzungstyp-unspezifisch wirksam. Ausschließlich in *M. mucedo* (+) induzierten die Verbindungen **7**, **8**, **10**, **12**, **13**, **16** und **17** die Carotinproduktion. Ausschließlich in *M. mucedo* (-) induzierten die Verbindungen **6**, **10**, **12**, **13** und **19** die Carotinproduktion. Die Verbindungen **10**, **12** und **13** induzierten dabei Kreuzungstyp-unspezifisch ausschließlich die Carotinsynthese. Drei von zwanzig Trisporoid-Verbindungen (**5**, **20**, **21**) zeigten keine Effekte (siehe Tab.4).

Tab.4: Vergleich von Carotinproduktion und Zygothorenbildung nach Trisporoid-Behandlungen (14 µg/Platte). Verbindung **2** induzierte in *M. mucedo* (+), Verbindung **14** und **16** induzierten in *M. mucedo* (-) und Verbindung **15** induzierte in beiden Kreuzungstypen parallel Carotinproduktion und Zygothorenbildung. Der Buchstabe a beschreibt, dass die Verbindung bioaktiv war, d.h. der Aktivitätswert (A = skaliertes Carotinhalt - Standardfehler) lag über 1,00 bzw. mehr als 2 Zygothoren waren erkennbar. Der Buchstabe n kennzeichnet, dass die Verbindung nicht bioaktiv war. Signifikant unterschiedliche Mittelwerte lagen vor bei P≤0.05 \*, P≤0.01 \*\*, P≤0.001 \*\*\*. Legende der Verbindungen siehe Abb.14

Verbindung	<i>M. mucedo</i> (+)		<i>M. mucedo</i> (-)	
	Carotinerhöhung	Zygothorenbildung	Carotinerhöhung	Zygothorenbildung
1	n	n	n	n
2	a*	a	n	n
3	a	a	n	n
4	a*	a	n	n
5	n	n	n	n
6	n	n	a*	n
7	a	n	n	n
8	a	n	n	n
9	n	n	a	a
10	a	n	a	n
11	a	a	n	n
12	a	n	a	n
13	a**	n	a*	n
14	a	a	a**	a
15	a**	a	a**	a
16	a	n	a*	a
17	a	n	a	a
18	a*	n	a**	n
19	n	n	a	n
20	n	n	n	n
21	n	n	n	n

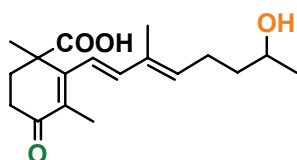


#### 4.3.6. Zusammenfassung der quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehungen in *Mucor mucedo* und *Blakeslea trispora* für den Carotinaufbau

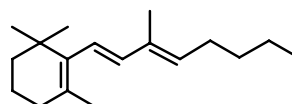
Die Abb.42 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse des Biotests zur Carotininduktion wodurch sich Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufstellen ließen.

Der Hauptunterschied der untersuchten Moleküle lag in den funktionellen Gruppen am C<sub>6</sub>-Ring und der Seitenkette. In *M. mucedo* war die Ketogruppe am C<sub>6</sub>-Ring und in *B. trispora* die Hydroxylgruppe entscheidend für eine Carotin-induzierende Wirkung. Weiterhin war in *M. mucedo* (+) die Hydroxylgruppe am C(13) der Seitenkette ein notwendiges Merkmal für hohe Carotininduktion. In *M. mucedo* (-) war die Ketogruppe entscheidend. Für die größte Carotin-induzierende Aktivität war in *M. mucedo* auch eine Carboxylgruppe am C<sub>6</sub>-Ring nötig, in *B. trispora* hingegen keine funktionelle Gruppe.

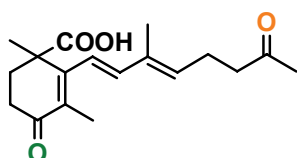
*M. mucedo* (+):



*B. trispora* (+):



*M. mucedo* (-):



*B. trispora* (-):

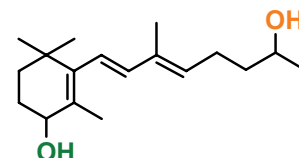


Abb.42: Darstellung der am stärksten Carotin-induzierenden Verbindungen. Entscheidende chemische Strukturmerkmale, die den Carotinaufbau in *M. mucedo* und *B. trispora* induzierten, befanden sich am C(1) und C(4) des Rings und am C(13) der Seitenkette des Moleküls. In *M. mucedo* war die Hydroxylgruppe am C(4) des Rings entscheidend für eine Carotininduktion und in *B. trispora* die Hydroxylgruppe. In *M. mucedo* induzierte das Trisporoidmolekül mit einer Carboxylgruppe am C(1) die höchste Carotinmenge, während in *B. trispora* keine funktionelle Gruppe nötig war. Der (+) Kreuzungstyp von *M. mucedo* benötigte für eine optimale Carotininduktion eine Hydroxylgruppe und der (-) Typ eine Ketogruppe am C(13).

### 4.4. Analyse der Genexpression nach Trisporoidbehandlung

Der Biotest zur Carotininduktion verdeutlichte die Stimulation der  $\beta$ -Carotinsynthese durch Trisporoide. Trisporoide als biosynthetische Abkömmlinge des  $\beta$ -Carotins haben eine regulative rückkoppelnde Wirkung, wodurch deren Produktion während des Kreuzungsvorgangs in einem selbststimulierenden Kreislauf zwischen  $\beta$ -Carotin und Trisporsäure ansteigt (Gooday (1968), Thmoas & Goodwin (1967)).

Um die Regulation durch Trisporoide auf genetischer Ebene zu prüfen, wurde in dieser Arbeit der direkte Einfluss von spezifischen Trisporoid-Verbindungen auf die Transkription unterschiedlicher Gene von *M. mucedo* und *B. trispora* im  $\beta$ -Carotin- und Trisporsäure-Stoffwechselweg untersucht. Dafür wurde die Menge der mRNA als Maß für die Transkription von bekannten Genen des Mevalonat- und Trisporsäure-Stoffwechselweges (siehe Abb.6) bestimmt. Als Methode der Wahl diente die real-time PCR, weil sie den direkten Vergleich von Transkriptleveln durch Ermittlung quantitativer Werte ermöglichte.

#### 4.4.1. Genexpressionsanalyse in *Mucor mucedo*

Aktin, ein Bestandteil des Cytoskeletts, wird durch das Gen *act* codiert. Aktin dient als Referenzgen, da es in allen Zellen und Stadien gleich intensiv exprimiert wird und somit den Expressions-Grundlevel darstellt (Choi *et al.* (1991)). Die Gene *hmgR1* und *hmgR2* kodieren für die Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Reduktase. Die HMG-CoA-Reduktase katalysiert die Umwandlung von HMG-CoA zu Mevalonat, einen einleitenden Schritt des Mevalonatweges zur Synthese von  $\beta$ -Carotin (siehe Abb.7). Die 4-DHMT-Dehydrogenase wird durch das Gen *tsp1* codiert. Das Enzym katalysiert die Reaktion von 4-DHMT zu Methyltrisporat im Trisporsäureweg (siehe Abb.6). Für *M. mucedo* lagen die Sequenzen der Gene *act*, *hmgR1* und *hmgR2* sowie *tsp1* vor und konnten für die Primerentwicklung herangezogen werden. Mittels einer Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde überprüft, ob die Primer das gewünschte Produkt vervielfältigten. Die PCR-Produkte ergaben Banden auf einem 1,5 %-igen Agarose-Gel mit den erwarteten Molekülgrößen. Die Bande für das Aktin-Gen *act* lag bei 190 bp, die Bande für *hmgR2* bei 250 bp, die Bande für *hmgR1* bei 190 bp und die Bande für *tsp1* bei 150 bp (siehe Tab.I im Anhang).

Die real-time PCR-Produkte wurden nachträglich auf einem Agarose-Gel überprüft und zeigten jeweils eine Gelbande in der erwarteten Größe des PCR-Produktes. Die real-

## Ergebnisse

time PCR fand demzufolge fehlerfrei statt. Die Abb. I B im Anhang zeigt als Beispiel die Ergebnisse eines Primertests, der zur Optimierung der real-time PCR-Methode diente. Die optimale Primerkonzentration wurde anhand der Stärke der Gel-Bande ausgemacht und lag bei 100 ng.

Bei jeder Genexpressions-Messung wurde zusätzlich eine Dissoziationskurve der Probe aufgenommen, um die Primer zu überprüfen (siehe Abb.43). Bei Erscheinen eines Peaks zur Schmelztemperatur des verwendeten Primers, wurde der Beweis geliefert, dass die real-time PCR erfolgreich war und keine Fehlpaarungen, z.B. Primerdimere auftraten. Bei allen Proben wurde eine korrekte Primeraktivität nachgewiesen. Zusätzlich wurden die Primer durch Sequenzieren ihrer PCR-Produkte auf ihre Funktionsfähigkeit überprüft (siehe Abb. II-IX im Anhang).

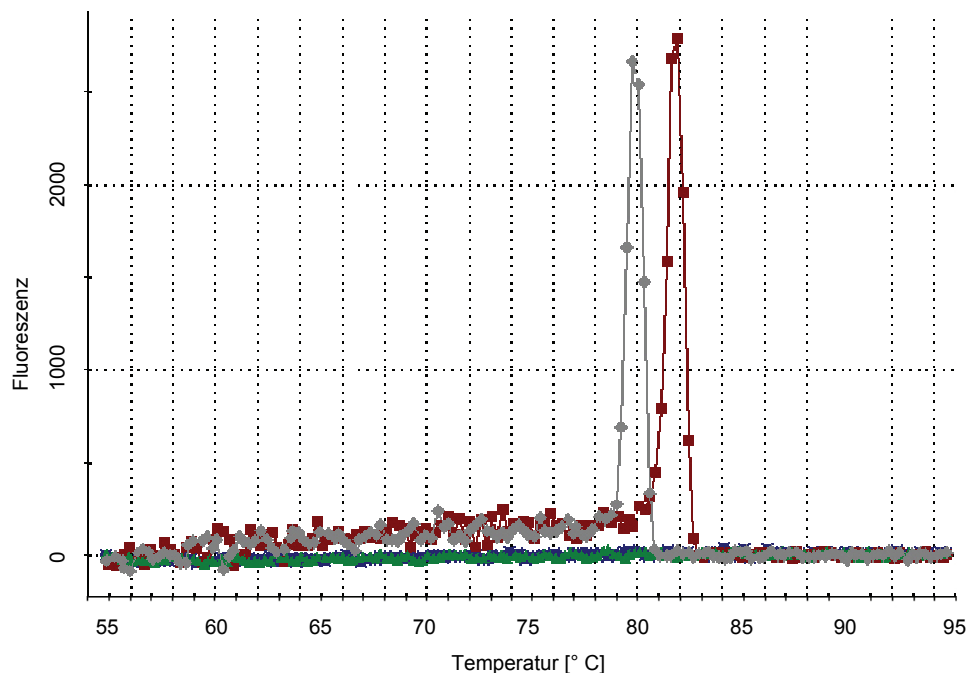


Abb.43: Beispiel-Dissoziationskurven der real-time PCR. Die graue Kurve zeigt den Fluoreszenzverlauf mit steigender Temperatur von 55 °C bis 95 °C bei Verwendung der *act*-Primer und pilzlicher cDNA. Die braune Kurve zeigt den Fluoreszenzverlauf bei Verwendung von *tsp3*-Primer und pilzlicher cDNA. Die grüne Kurve kennzeichnet die Negativkontrolle. Bei 55 °C lagern die Primer an den DNA-Einzelstrang an, bei 72 °C verlängert sich der DNA-Doppelstrang bis zum Erreichen der Schmelztemperatur, die für *act* bei 80 °C und für *tsp3* bei 82 °C lag. Das Schmelzen der Produkte resultiert in einem sofortigen Abfall der Fluoreszenz durch die Dissoziation von SYBR Green vom DNA-Doppelstrang. Primer-Dimere besitzen eine niedrigere Schmelztemperatur (75 °C) als die erwarteten PCR-Produkte, und deren Auftreten wurde aufgrund der Ergebnisse ausgeschlossen.

## Ergebnisse

Die Probenanalyse mittels der real-time PCR erfolgte durch eine Fluoreszenzmessung. Mit Hilfe des in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green wurde die Zyklusanzahl ermittelt, bei der der Anstieg der DNA-Menge über einen errechneten Schwellenwert stattfand. Je mehr mRNA, bzw. daraus umgewandelte DNA, als Ausgangsmaterial vorlag, umso schneller wurde der Schwellenwert erreicht, also umso geringer war die Anzahl der Zyklen der PCR. Die Transkription des Gens für Aktin diente als Vergleichslevel, also zur Normierung der Transkription der zu untersuchenden Gene. Mit der vergleichenden Methode ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode) nach Livak and Schmittgen (2001) wurde die relative Gentranskription berechnet, um die Proben miteinander vergleichen zu können. Mit Lösungsmittel (20 % Ethanol v/v) behandelte Kulturen dienten als Kontrollen und unbehandelte Kulturen wurden als Kalibrierungswerte (Wert = 1) eingesetzt. Trisporsäure B (**14**) und C (**15**) (14 µg/Platte) veränderten die Transkription von *hmgR1* und *hmgR2* in *M. mucedo* nach 6 und 24 h Inkubation nicht signifikant (siehe Abb.44).

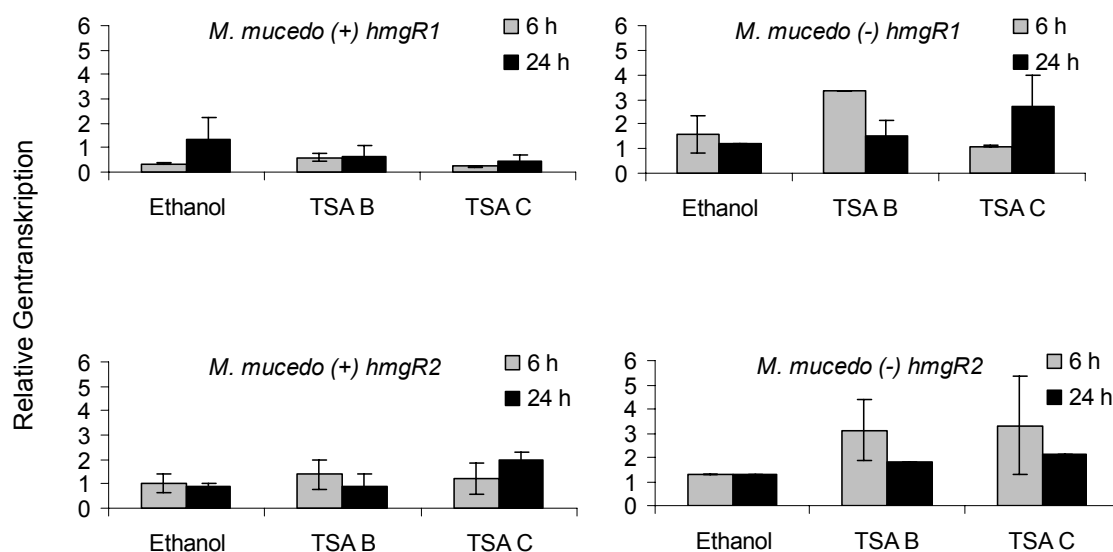


Abb.44: Die real-time PCR Messungen der Transkriptlevel von *hmGR1* und *hmGR2* aus Trisporsäure-behandelten *M. mucedo* Kulturen zeigten, dass Trisporsäure B und C (14 µg/Platte) keinen Einfluss auf die Transkription der Gene *hmGR1* und *hmGR2* in *M. mucedo* nach 6 und 24 h Inkubation hatten. TSA = Trisporsäure (n = 3)

Die Transkription von *tsp1* wurde durch Behandlung mit Trisporsäure-haltigem Pilzextrakt (10 µg/Platte Trisporsäuren) für 24 h ebenfalls nicht verändert (siehe Abb.45). Da in früheren Untersuchungen (Schimek *et al.* (2005)) gezeigt wurde, dass *tsp1* post-transkriptionell reguliert ist, wurde auf Untersuchungen mit weiteren Testsubstanzen und Konzentrationen an *M. mucedo* verzichtet.

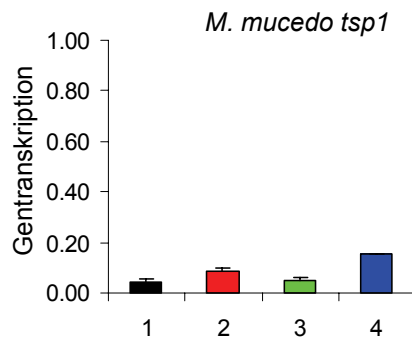


Abb.45: Die real-time PCR Messung der Transkriptlevel von *tsp1* aus Trisporoid-behandelten *M. mucedo* Kulturen zeigte, dass Trisporsäure-haltiges Pilzextrakt (10 µg Trisporsäure) keinen Einfluss auf die Transkription von *tsp1* in *M. mucedo* hatte. (n=4)

1 = *M. mucedo* (+) 10 µg /Platte Trisporsäuren aus Pilzextrakt, 2 = *M. mucedo* (-) 10 µg/Platte Trisporsäuren aus Pilzextrakt, 3 = *M. mucedo* (+) Ethanol, 4 = *M. mucedo* (-) Ethanol

### 4.4.2. Genexpressionsanalyse in *Blakeslea trispora*

Für *B. trispora* waren die Gensequenzen für Aktin (*act*), für die Enzyme HMG-CoA-Reduktase (*hmgR*), 4-DHMT-Dehydrogenase (*tsp1*) und zusätzlich für die Phytoen-Dehydrogenase (*carB*) des Mevalonat-Stoffwechselweges und Carotin-Oxygenase (*tsp3*) des Trisporoid-Stoffwechselweges bekannt (siehe Abb.6). Die Bande in der überprüfenden Gelelektrophorese für *carB* lag bei 210 bp, die Bande für *hmgR* bei 230 bp, die Bande für *tsp3* lag bei 260 bp und die Bande für *act* lag bei 258 bp (siehe Anhang). Die Primer wurden durch Dissoziationskurven und Sequenzierung der PCR-Produkte auf ihre Richtigkeit überprüft.

#### 4.4.2.1. *CarB* und *tsp3* sind Gene im Carotinaufbauweg und Carotinabbauweg, die durch Trisporoide transkriptionell reguliert werden

Die Transkriptlevel der vier bekannten Gene des Carotinauf- und -abbauweges von *B. trispora* wurden verglichen, um aufzuklären welche der Gene reguliert wurden. Als Testsubstanz diente die als Sexualhormon beschriebene Trisporsäure B (**14**). Trisporsäure B (**14**) bewirkte einen nachweisbaren metabolischen Effekt auf *B. trispora* (-) (siehe Abb.40 B).

Nach Behandlung mit Trisporsäure B (**14**) (14 µg/Platte) und 6 h Inkubation zeigte sich, dass die Transkription der Gene *hmgR* und *tsp1* nicht beeinflusst wurde (siehe Abb.46 A, D). Die Transkription von *carB* und *tsp3* hingegen wurde durch Trisporsäure B (**14**) in beiden Kreuzungstypen von *B. trispora* um ein 5-faches, bzw. für *tsp3* bei *B. trispora* (+) um ein 12-faches gegenüber dem Kontrollwert, erhöht (siehe Abb.46 B, C). Bei den (+) Kreuzungstypen ergaben sich stark signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und behandelter Probe ( $P < 0,001$ ). Der Transkriptlevel von *tsp3* wurde im (+) Kreuzungstyp bei Einsatz der gleichen Menge Trisporsäure B (**14**) stärker erhöht als der

## Ergebnisse

Transkriptlevel von *carB*. Trisporsäure B (**14**) hatte folglich einen induktiven Effekt auf die Transkription der Gene *carB* und *tsp3*.

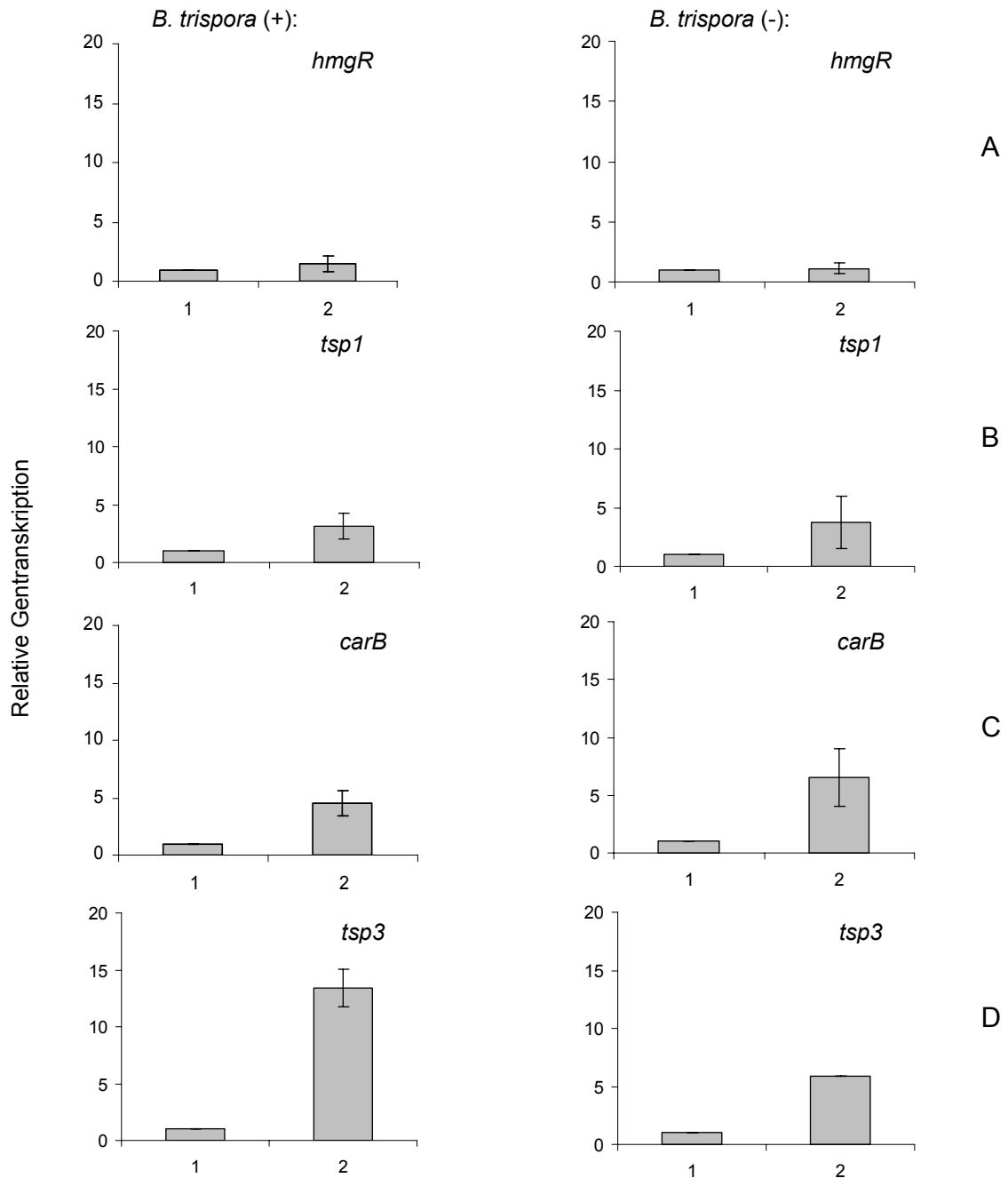


Abb.46: Die real-time PCR Messungen der Transkriptlevel von *hmgR* (A), *tsp1* (B), *carB* (C) und *tsp3* (D) aus Trisporsäure B-behandelten *B. trispora* Kulturen (links: *B. trispora* (+), rechts: *B. trispora* (-)) zeigten, daß 14 µg/Platte Trisporsäure B (**14**) die Transkription von *carB* und *tsp3* beeinflussten, aber die Transkription von *hmgR* und *tsp1* nicht veränderten. (n=3)  
1 = Kontrolle, 2 = 14 µg/Platte Trisporsäure B (**14**)

## Ergebnisse

---

Zusätzlich wurden kinetische Untersuchungen durchgeführt, um den optimalen Zeitpunkt für vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Testsubstanzen zu ermitteln. Um sicher im aktivierenden Bereich der Substanz zu liegen, wurde eine höhere Konzentration an Trisporsäure B (**14**) (56 µg) eingesetzt, als sie im Biotest zur Carotininduktion für einen metabolischen Effekt nötig war (14 µg/Platte). Um zu ermitteln, nach welcher Inkubationszeit eindeutige Transkriptionsunterschiede messbar waren, wurden Kinetiken für die Gene *hmgR*, *carB* und *tsp3* aufgenommen. *B. trispora* wurde mit 56 µg Trisporsäure B (**14**) pro Platte behandelt und nach den Zeitpunkten 0, 1, 3, 6, 12, 24 und 48 h die Transkriptlevel per real-time PCR gemessen.

Die Transkription von *hmgR* in beiden Kreuzungstypen von *B. trispora* veränderte sich bis zu einer Inkubationszeit von 48 h nicht (siehe Abb.47).

Der Transkriptlevel von *carB* zeigte bereits nach 1 Stunde Inkubation eine starke Erhöhung um ein 130-faches im (+) und um ein 100-faches im (-) Kreuzungstyp (siehe Abb.48). Das Gleichgewicht stellte sich nach 6 h im (+) Typ bei einer 20-fachen Erhöhung und nach 3 h im (-) Typ bei einer 40-fachen Erhöhung ein.

Ein ähnliches Bild ergab sich für *tsp3*. Der Transkriptlevel von *tsp3* erhöhte sich nach 1 Stunde Inkubation im (+) Typ auf ein 500-faches und im (-) Typ auf ein ca. 100-faches des Kontrollwertes (siehe Abb.49). Das Gleichgewicht wurde im (+) Typ nach 12 h bei einer 50-fachen Erhöhung und im (-) Typ nach 3 h bei einer 30-fachen Erhöhung erreicht.

Zusammenfassend war nach einer Inkubationszeit von 6 h eine eindeutige Transkriptionserhöhung auf dem Gleichgewichtslevel bei den Genen *carB* und *tsp3* messbar, währendem das Gen *hmgR* unbeeinflusst blieb.

## Ergebnisse

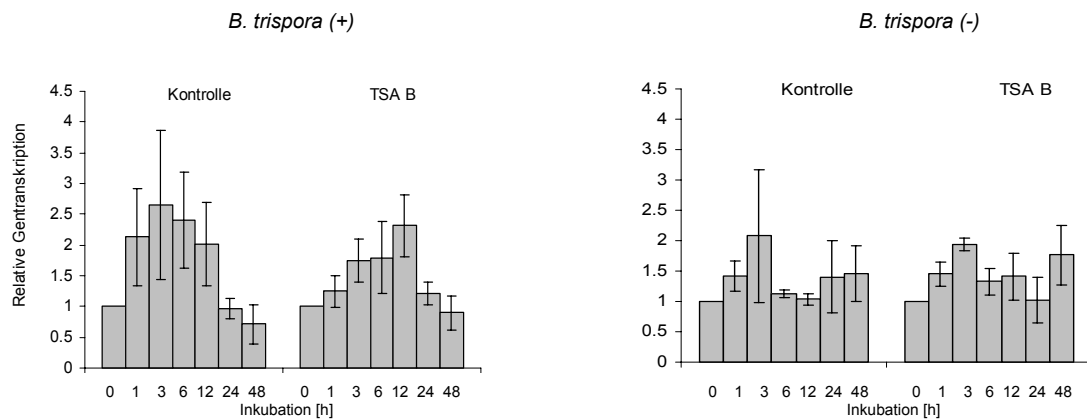


Abb.47: Die real-time PCR Messung der Transkriptlevel von **hmgR** aus Trisporsäure B (TSA B)-behandelten *B. trispora* Kulturen zeigte, dass 56 µg/Platte Trisporsäure B die **hmgR**-Transkription nicht beeinflussten. (n=5)

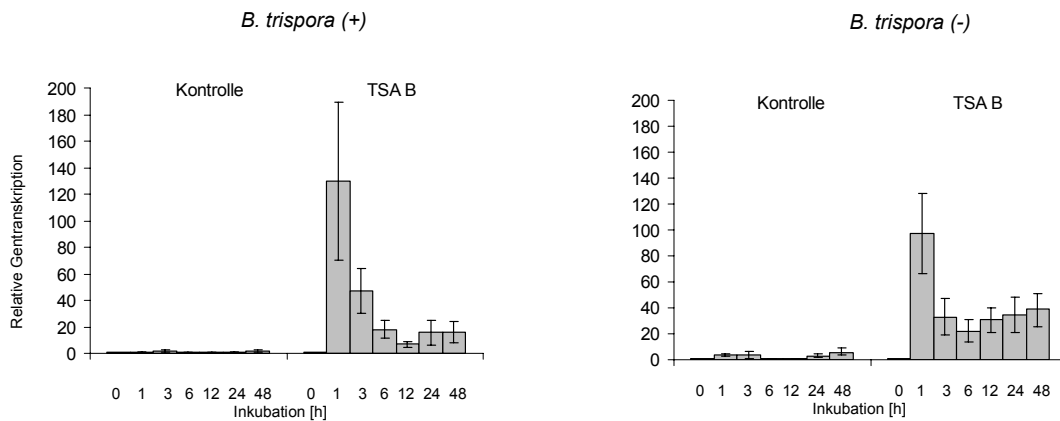


Abb.48: Die real-time PCR Messung der Transkriptlevel von **carB** aus Trisporsäure B (TSA B)-behandelten *B. trispora* Kulturen zeigte, dass 56 µg/Platte Trisporsäure B die Transkription von **carB** innerhalb der ersten Stunde beeinflussten. (n=5)

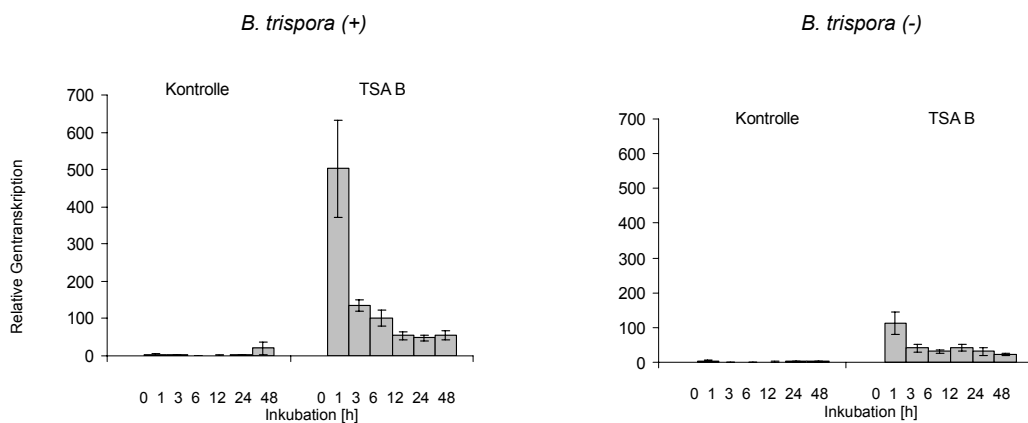


Abb.49: Die real-time PCR Messung der Transkriptlevel von **tsp3** aus Trisporsäure B (TSA B)-behandelten *B. trispora* Kulturen zeigte, daß 56 µg/Platte Trisporsäure B die Transkription von **tsp3** innerhalb der ersten Stunde beeinflussten. (n=5)



### 4.4.2.2. Regulativ wirksame Trisporoide beeinflussen die Transkriptlevel von *tsp3*

Die sexuelle Kommunikation in *B. trispora* wird durch Trisporoide vermittelt (Gooday (1994)). Die Trisporoidproduktion wird während des sexuellen Kreuzungsvorgangs durch einen selbststimulierenden Rückkopplungszyklus erhöht (Thomas & Goodwin (1967)). Um spezifische Strukturmerkmale regulierender Signalverbindungen zu bestimmen, wurde der direkte Einfluss 20 verschiedener Trisporoidverbindungen auf die Transkription des Gens für die Carotin-Oxygenase *tsp3* mittels real-time PCR untersucht.

Trisporsäure C (**15**) (14 µg/Platte) bewirkte eine 30- bis 40-fache Transkriptionserhöhung von *tsp3* in beiden Kreuzungstypen von *B. trispora* (siehe Abb.50). Die Kinetik zeigte, dass nach 6 h Inkubation mit 14 µg Trisporsäure C (**15**) pro Platte ein stationäres Expressionsniveau erreicht war. Somit wurden die experimentellen Bedingungen für den Wirksamkeitsvergleich der verschiedenen Trisporoid-Verbindungen bei einer Konzentration von 14 µg/Platte der Testsubstanz, wie sie schon im Biotest zur Carotininduktion eingesetzt wurde, und 6 h Inkubation festgelegt. Die Wirksamkeit der Testsubstanzen wurde im folgenden anhand der Transkriptlevel des Gens *tsp3* ermittelt.

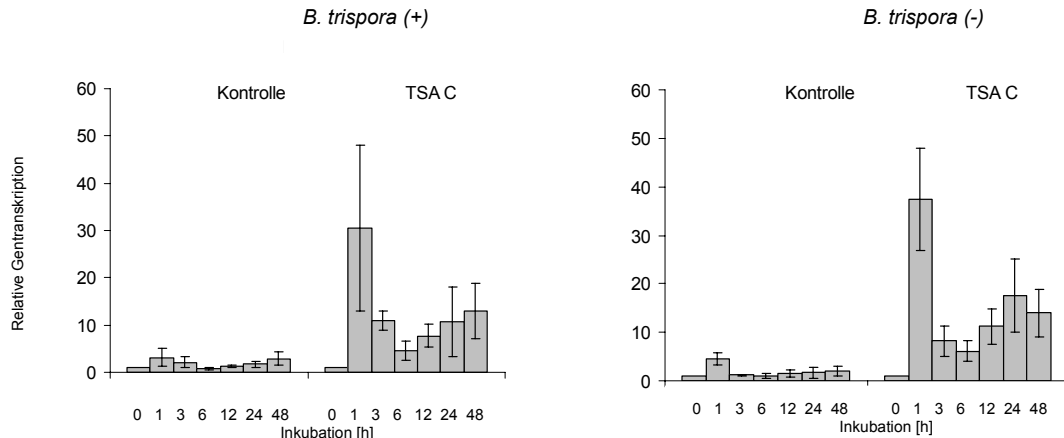


Abb.50: Die real-time PCR Messung der Transkriptlevel von *tsp3* aus Trisporsäure C (TSA C)-behandelten *B. trispora* Kulturen zeigte, dass 14 µg/Platte Trisporsäure C die Transkription von *tsp3* innerhalb der ersten Stunde beeinflussten. (n=5)

Die Abb.51 zeigt die Transkriptlevel von *tsp3* bei *B. trispora* nach Stimulation mit 20 verschiedenen Trisporoidverbindungen, wie sie schon im Biotest zur Carotininduktion verwendet wurden.

Der (+) Kreuzungstyp wies einen starken Anstieg der *tsp3* Transkriptlevel nach Behandlung mit Verbindung **3** (27-facher Anstieg gegenüber der Kontrolle), Verbindung

## Ergebnisse

**14** (27-facher Anstieg) und Verbindung **4** (11-facher Anstieg) auf (siehe Abb.51). Der (+) Kreuzungstyp zeigte einen geringen Anstieg der *tsp3* Transkriptlevel nach Behandlung mit den Verbindungen **5, 8, 9 und 15-21** (2- bis 5-facher Anstieg). Der (-) Kreuzungstyp reagierte stark auf Verbindung **9** und **14** (12-facher Anstieg) sowie schwach auf Verbindung **15, 17 und 18** (2- bis 7-facher Anstieg). Ausschließlich der (+) Typ reagierte auf Verbindung **5, 8, 19, 20 und 21** und besonders stark auf Verbindung **3** und **4**.

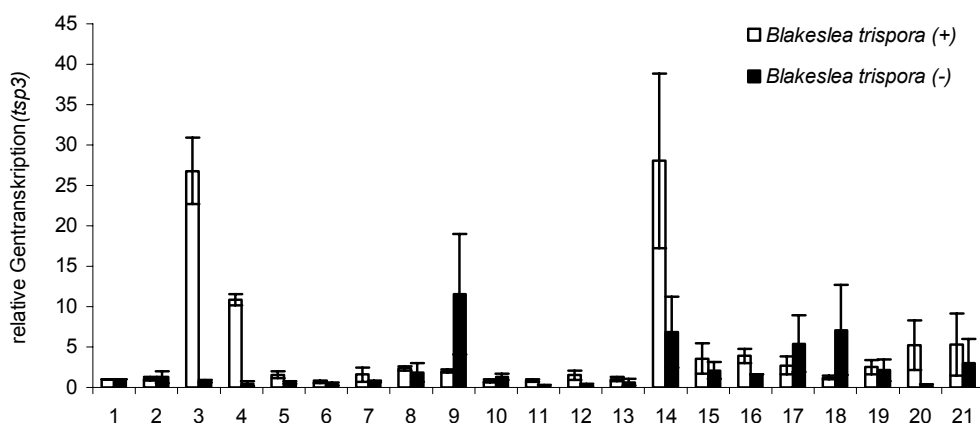


Abb.51: Die real-time PCR Messung der Transkription von *tsp3* aus Trisporoidanalog-behandelten *B. trispora* Kulturen zeigte, dass 14 µg/Platte der Trisporoid-Verbindungen **3, 4, 14** die *tsp3*-Transkription in *B. trispora* (+) eindeutig induzierten und die Verbindungen **9, 14, 17, 18** die *tsp3*-Transkription in *B. trispora* (-) weniger deutlich induzierten. (n=3); Legende der Verbindungen 1-21 siehe Abb.14

Die Aktivitätswerte der Transkriptionsinduktion wurden analog zum Biotest zur Carotininduktion ermittelt. Die Transkription des putativen Carotinspaltungs-Gens *tsp3* aus *B. trispora* (+) wurde stark durch die Verbindung **3** (A = 19,17), **4** (A = 9,68) und **14** (A = 9,32) und schwach durch Verbindung **8** (A = 1,91) and **9** (A = 1,70) induziert (siehe Tab.5). Die Ergebnisse zeigten, dass die Ketogruppe wichtig für die Transkriptionserhöhung von *tsp3* war als die Hydroxylgruppe, die im Carotintest entscheidend für eine starke Aktivität war. Die funktionelle Gruppe am C(13) der Seitenkette war unerlässlich, um eine transkriptionelle Aktivierung auszulösen, wobei Keto- und Hydroxylgruppen Effekte bewirkten. Der (-) Kreuzungstyp reagierte mit Transkriptionserhöhung, wenn eine Carboxylgruppe am Ring vorlag, die für den (+) Kreuzungstyp nicht so ausschlaggebend war. Trisporin B (**2**) und C (**3**) waren (+) Kreuzungstyp-spezifisch, Methyltrisporat C (**17**) (-) Kreuzungstyp-spezifisch und Trisporinsäure B (**14**) war Kreuzungstyp-unspezifisch wirksam.

## Ergebnisse

Schlussfolgernd lässt sich Trisporsäure B (**14**) als ein starker Regulationsfaktor auf genetischer Ebene in beiden Kreuzungstypen von *B. trispora* beschreiben. Trisporin B (**3**) und Trisporin C (**4**) sind im (+) Typ und Dihydromethyltrisporat C (**9**) im (-) Typ als starke Regulationsfaktoren charakterisierbar.

Tab.5: *tsp3*-Transkription-induzierende Verbindungen wurden nach abnehmender Aktivität aufgelistet. Verbindungen mit einem Aktivitätswert (A = relative Gentranskription - Standardfehler) über 1,00 erhöhten die *tsp3*-Transkription in *B. trispora* nicht signifikant (n.s.) oder signifikant bei  $P \leq 0.05$ . Legende der Verbindungen siehe Abb.14

	Verbindung	Aktivitätswert A	Signifikanz P
<b><i>B. trispora</i> (+)</b>	<b>3</b>	22.71	0.00002
	<b>14</b>	17.25	0.011
	<b>4</b>	10.18	0.000002
	<b>20</b>	2.14	0.008
	<b>8</b>	2.10	0.001
	<b>9</b>	1.84	0.010
	<b>15</b>	1.71	0.005
	<b>19</b>	1.63	0.063
	<b>17</b>	1.60	0.015
	<b>21</b>	1.49	0.033
	<b>5</b>	1.14	n.s.
<b><i>B. trispora</i> (-)</b>	<b>18</b>	1.01	n.s.
	<b>9</b>	4.05	0.014
	<b>14</b>	2.47	0.014
	<b>17</b>	1.91	0.016
	<b>18</b>	1.52	0.047
	<b>15</b>	1.04	0.056

### 4.4.2.3. Manche Trisporoide induzieren gleichzeitig die Carotinproduktion und die *tsp3* Transkription in *Blakeslea trispora*

Bei *B. trispora* wurde als Vergleichsparameter zur Carotinsynthese die Genexpression von *tsp3* untersucht, da eine Zygothorenbildung, wie für *M. mucedo* beschrieben, mikroskopisch nicht sichtbar war. Das Gen *tsp3* codiert für eine Carotin-Oxygenase, die einen sehr frühen Schritt im Trisporsäure-Biosyntheseweg katalysiert und wurde im Kapitel 4.4.2.1. als durch Trisporsäure reguliertes Gen beschrieben.

Eine Korrelation zwischen den beiden Antworten erhöhte Carotinproduktion und *tsp3* Transkription in *B. trispora* nach Trisporoidbehandlung lag nur in einigen Fällen, vorwiegend im (-) Kreuzungstyp, vor (siehe Tab.6). Bei Applikation von 14 µg/Platte

## Ergebnisse

bewirkten die Verbindungen **8, 12, 17** und **21** in *B. trispora* (+) und die Verbindungen **16** und **17** in *B. trispora* (-) eine Aktivierung beider Antworten, nämlich der Carotinproduktion und der *tsp3* Transkription. Die Verbindungen **9, 14, 15** und **17** bewirkten parallel eine Induktion beider Antworten in beiden Kreuzungstypen. Die Verbindungen **9, 14, 15** und **17** waren demnach unabhängig vom Kreuzungstyp auf die *tsp3* Transkription und Carotin-Biosynthese induzierend wirksam. In *B. trispora* (+) induzierte die Verbindung **7** ausschließlich die Carotinproduktion und die Verbindungen **3, 4, 5, 16, 19** und **20** nur die Transkription von *tsp3*. In *B. trispora* (-) induzierten die Verbindungen **2, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 13** und **21** ausschließlich die Carotinproduktion und die Verbindungen **18** und **19** nur die Transkription von *tsp3*. Die Verbindung **7** induzierte dabei unabhängig vom Kreuzungstyp ausschließlich die Carotinproduktion und Verbindung **19** die Transkription von *tsp3*. Eine von zwanzig Trisporoid-Verbindungen (**6**) verursachte keine Aktivierung einer der beiden Antworten. Die Aktivitätswerte der Transkriptionsinduktion waren für den (-) Kreuzungstyp stets geringer als für den (+) Kreuzungstyp.

Tab.6: Der Vergleich der Induktion der Carotinsynthese und Transkription von *tsp3* nach Trisporoidbehandlung zeigte Übereinstimmungen der Wirksamkeit bei beiden Kreuzungstypen durch Verbindung **9, 14, 15** und **17**. Die Verbindungen **8, 12, 16** und **21** zeigten innerhalb der Kreuzungstypen gleiche Wirksamkeit.

Der Buchstabe a beschreibt, dass die Verbindung bioaktiv war, d.h. der Aktivitätswert lag über 1,00. Der Buchstabe n kennzeichnet, dass die Verbindung nicht bioaktiv war. Signifikant unterschiedliche Mittelwerte lagen vor bei  $P \leq 0.05$  \*,  $P \leq 0.01$  \*\*,  $P \leq 0.001$  \*\*\*.

Legende der Verbindungen siehe Abb.14

	<i>B. trispora</i> (+)		<i>B. trispora</i> (-)	
Verbindung	Carotin- erhöhung	<i>tsp3</i> Transkriptions- erhöhung	Carotin- erhöhung	<i>tsp3</i> Transkriptions- erhöhung
<b>1</b>	n	n	n	n
<b>2</b>	n	n	a	n
<b>3</b>	n	a***	n	n
<b>4</b>	n	a***	n	n
<b>5</b>	n	a	a**	n
<b>6</b>	n	n	n	n
<b>7</b>	a	n	a**	n
<b>8</b>	a	a**	a**	n
<b>9</b>	a	a**	a***	a*
<b>10</b>	n	n	a	n
<b>11</b>	n	n	a	n
<b>12</b>	a	a	a	n

## Ergebnisse

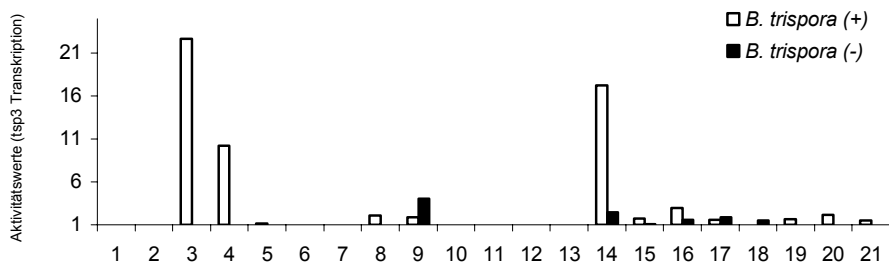
Tab.6: Fortsetzung

	<i>B. trispora</i> (+)		<i>B. trispora</i> (-)	
Verbindung	Carotin- erhöhung	<i>tsp3</i> Transkriptions- erhöhung	Carotin- erhöhung	<i>tsp3</i> Transkriptions- erhöhung
<b>13</b>	n	n	a	n
<b>14</b>	a	a**	a*	a*
<b>15</b>	a	a**	a	a*
<b>16</b>	n	a***	a*	a***
<b>17</b>	a	a*	a**	a*
<b>18</b>	n	n	n	a*
<b>19</b>	n	a*	n	a*
<b>20</b>	n	a**	n	n
<b>21</b>	a	a*	a	n

Analog zur Carotininduktion, zeigten auch die Transkriptions-Daten, dass die Verbindungen **14-17** und **9** in *B. trispora* (-) und die Verbindung **8, 9, 14, 15** und **17** im (+) Kreuzungstyp wirksam waren (siehe Tab.6 und Abb.52). Die Verbindungen **7, 12** und **13** die stark Carotin-induzierend wirksam waren, zeigten keine Transkriptionsinduktion. Für die Transkriptionsregulation scheint die Ketogruppe am C(4) des Kohlenstoffrings wichtiger zu sein, als für die Regulation der Carotinproduktion, bei der die Trisporoid-Verbindungen mit einer Hydroxylgruppe am C(4) am stärksten wirkten. Zusätzlich waren jedoch auch die Verbindung **8** und **9** mit einer Hydroxylgruppe am Ring und an der Seitenkette aktiv. Die *tsp3* Transkription wurde vorwiegend im (+) Typ stimuliert.

Die Stimulation des metabolischen und des genetischen Prozesses wurde teils durch unterschiedliche Trisporoide reguliert und könnte somit unterschiedliche Regulationswege aufweisen.

### A: *tsp3* Transkription



### B: Carotinproduktion

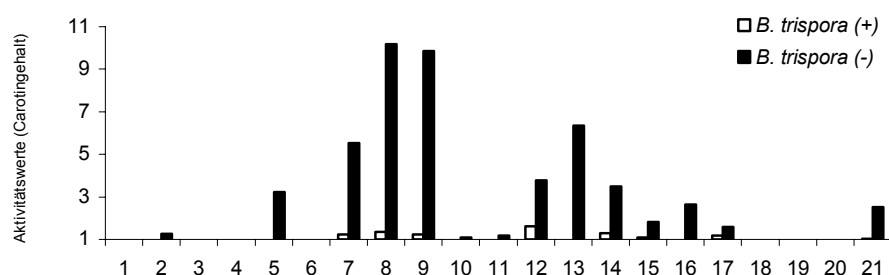


Abb.52: Vergleich der Aktivitätswert-Darstellungen der Induktion der Transkription von *tsp3* (A) und Carotinproduktion (B) nach Trisporoidbehandlung (14 µg/Platte) von *B. trispora* Kulturen. Der Vergleich der Aktivitätswerte aller untersuchten Trisporoid-Verbindungen für die Induktion der *tsp3* Transkription und Carotinproduktion zeigte eine übereinstimmende Induktion durch Verbindung 9, 14-17 im (-) Kreuzungstyp und bei Verbindung 8, 9, 14, 15, 17 im (+) Kreuzungstyp. Legende der Verbindungen 1-21 siehe Abb.14

#### 4.4.2.4. Zusammenfassung der quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehungen in *Blakeslea trispora* für den Carotinabbau

Die auf die *tsp3* Transkription wirksamsten Trisporoide sind in der Abb.53 zu sehen. In *B. trispora* (+) trugen die aktivsten Verbindungen als funktionelle Gruppen am C(4) und C(13) Ketogruppen und in *B. trispora* (-) Hydroxylgruppen. In *B. trispora* (-) war ebenfalls die funktionelle Gruppe am C(1) wichtig für eine induktive Wirkung.

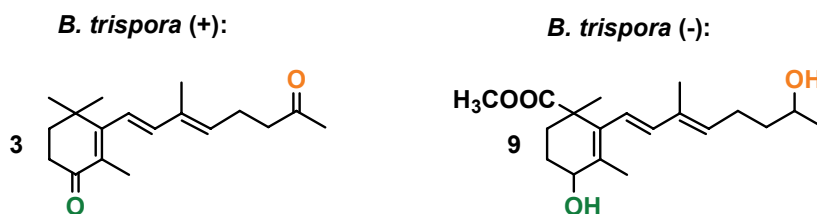


Abb.53: Darstellung der stärksten transkriptionellen Regulationsfaktoren. Entscheidende chemische Strukturmerkmale, die die *tsp3* Transkription in *B. trispora* induzierten, befanden sich am C(4) und C(13). In *B. trispora* (-) war ebenfalls die funktionelle Gruppe am C(1) bestimmend.

## 5. Diskussion

### 5.1. Zygomyceten produzieren flüchtige Verbindungen

Von Pilzen produzierte, flüchtige Verbindungen sind im Gasraum z.B. mit der Kopplung von Tenax-Fallen oder SPME mit GC/MS analysierbar (Combet *et al.* (2006)). Die Produktion von z.B. Dekan oder 2-Methyl-1-butanol wird bei Fiedler *et al.* (2001) für *Mucor sp.* beschrieben. Die Produktion von C<sub>8</sub>-Verbindungen, wie 1-Okten-3-ol und 3-Oktanol wird bei Nabeta *et al.* (1980) für *B. trispora* beschrieben. Die flüchtigen C<sub>8</sub>-Oxylipine 1-Okten-3-ol und 3-Oktanol werden über den Fettstoffwechsel aus Linolensäure biosynthetisch hergestellt (Combet *et al.* (2006)). Flüchtige Verbindungen von Zygomyceten können der Kommunikation mit anderen Organismen dienen. Das Auftreten und die Konzentration mikrobieller, flüchtiger Verbindungen hängen vom Lebensraum ab, z.B. von der Kohlenstoffquelle. Vertreter der Zygomycetenordnung Mucorales leben saprotroph vorwiegend im Erdboden, aber auch auf verdorbenen Lebensmitteln oder Früchten. Zygomyceten können auf feuchtem, verrottendem Getreide existieren und könnten dort vorkommenden Organismen, wie z.B. Getreidekäfern, als Nahrung dienen. Da Getreidekäfer z.B. die Verbindungen 2-Methyl-1-butanol, 1-Okten-3-ol und 3-Oktanol, die von Zygomyceten produziert werden, als Nahrungs-Erkennungssignale nutzen, besteht die Möglichkeit, dass den Käfern auch Zygomyceten als Nahrung dienen. Zwischen den Zygomyceten *B. trispora* oder *M. mucedo* und Getreidekäfern ist aus der Literatur keine ökologische Beziehung bekannt. *Drosophila melanogaster* reagiert auf Verbindungen aus überreifen Früchten (Stensmyr *et al.* (2003)). Einige für *D. melanogaster* physiologisch aktive Verbindungen aus Fruchtexttrakten werden auch von Pilzen produziert. *B. trispora* bildet z.B. Isoamylalkohol und Phenethanol (Nabeta *et al.* (1980)) und *Mucor sp.* Butandiol (Fiedler *et al.* (2001)), das von Fruchtfliegen erkannt werden kann. Im Labor war im Rahmen dieser Arbeit zu beobachten, dass Fruchtfliegen von *M. mucedo* Kulturen angelockt wurden und durch kleine Öffnungen in der Petrischale zum Pilzmyzel fanden. Diese Beobachtung bestärkt die Vermutung, dass Zygomyceten wie *M. mucedo* Verbindungen produzieren, die attraktiv für Fruchtfliegen sind. Zwischen *M. mucedo* und *Drosophila melanogaster* ist laut Literatur keine ökologische Beziehung bekannt.

Zygomyceten bilden zur vegetativen Vermehrung unbegeißelte Sporen, sogenannte asexuelle Aplanosporen, die über Wind oder Regen verbreitet werden. Für ihre

Verbreitung wäre es daher sinnvoll, auch mobile Insekten zum Sporentransport anzulocken. Möglicherweise dienen die Insekten-anlockenden Verbindungen der Zygomyceten dem Zweck der Sporenverbreitung. Durch den Nachweis flüchtiger C<sub>8</sub>-Verbindungen ist eine ökologische Beziehung zwischen Zygomyceten und Insekten denkbar, aber bisher nicht nachgewiesen.

Bei Combet *et al.* (2006) wird beschrieben, dass flüchtige C<sub>8</sub>-Verbindungen wie Okt-1-en-3-on, *rac*-Okt-1-en-3-ol, *rac*-Oktan-3-ol, Oktan-1-ol und Oktan-3-on den Keimungsprozess blockieren, wenn Pilzsporen in zu hoher Dichte auftreten. Dieser so genannte „crowding effect“ ist bei Ascomyceten und Zygomyceten nachgewiesen worden.

Im Zygophoren-Biotest wurde im Rahmen dieser Arbeit keine sexuelle Aktivierung durch Oktanon, Oktanol, Oktadecanol oder Decen festgestellt. In der vorliegenden Arbeit wurden mit CLS gesammelte, flüchtige Verbindungen von *M. mucedo* anschließend mit GC/MS analysiert.

Im Vergleich zum flüchtigen Pilzduftstoff Okt-1-en-3-ol, ist das Sexualhormon Trisporsäure aufgrund seiner chemischen Eigenschaften sehr schwach flüchtig. Vorstufen der Trisporsäure-Biosynthese, wie 4-DHMT oder Trisporin könnten jedoch aufgrund ihrer Flüchtigkeit als Pheromone über den Gasraum wirken.

Banbury (1954), Plempel & Dawid (1961) und Mesland *et al.* (1974) machten verschiedene Biotests mit Pilzkulturen und -extrakten und schlussfolgerten, dass Pheromone von *M. mucedo* flüchtig sein müssen. Für die Untersuchungen flüchtiger Pheromone im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde *M. mucedo* verwendet, da diese Art ein gerichtetes Wachstum der Zygophoren aufeinanderzu zeigt (Plempel (1957)). Die dafür möglicherweise verantwortlichen flüchtigen Pheromone müssen nur auf einer kurzen Strecke wirksam sein und in niedrigen Konzentrationen auftreten. Diese Eigenschaften können einen analytischen Nachweis erschweren.

Mit Hilfe von neu entwickelten Biotests wurde in der vorliegenden Arbeit zuerst ein biologischer Nachweis geführt, dass Verbindungen, die eine Zygophorenbildung induzieren, durch die Luft diffundieren. Der Austausch von flüchtigen Pheromonen kann die postulierte kooperative Synthese von Trisporsäure (Sutter (1987)) ermöglichen, indem die Vorstufen durch die Luft diffundieren und so den Kreuzungspartner erreichen. Die flüchtigen Pheromone können auch als Stimulator wirken, um Regulationsprozesse anzuschalten. Bisher wurde in der Literatur die Wirksamkeit von gereinigten Trisporoiden im Zygophorentest beschrieben, wobei eine Substratdiffusion nicht



ausgeschlossen wurde (z.B.: Austin *et al.* (1969), van den Ende (1976), Schachtschabel *et al.* (2005)). Trisporin A (**2**), B (**3**) und C (**4**) z.B. induzieren im Zygophorentest in *M. mucedo* (+) Zygophoren. Die Induktion der morphologischen Sexualreaktion ist damit bewiesen, jedoch nicht die Wirkung über den Luftraum. In dieser Arbeit gelang mit Hilfe des vom Zygophorentest abgewandelten Fläschchentests der erstmalige Nachweis, dass die Reinsubstanzen Trisporin A (**2**) und B (**3**) über die Gasphase wirksam sind. Eine Substratdiffusion wurde beim Fläschchentest ausgeschlossen, so dass die Wirkung ausschließlich über den Gasraum erfolgte. Der Wirkungsweg von Trisporsäurevorstufen, wie Trisporin A und B, ist demzufolge über die Luft möglich und könnte an den Zygophorenspitzen zur Partnererkennung stattfinden.

### **5.2. *Mucor mucedo* Kreuzkulturen produzieren flüchtige, Zygophoren-induzierende Trisporoide**

Mit Hilfe der gekoppelten CLS-GC/MS gelang zusätzlich ein erster analytischer Hinweis auf die Produktion eines über die Gasphase wirksamen Ketotrisporoids (**11**). Die Verbindung ließ sich synthetisch herstellen und diente als Referenzsubstanz zur Identifikation. Das Ketotrisporoid (**11**) wurde bei Gessler *et al.* (2002) als Trisporsäure-Vorstufe beschrieben. Fütterungsexperimente zeigten, dass das  $\beta$ -C<sub>18</sub>-Keton (**6**) (Schachtschabel & Boland (2007)) und das flüchtige Ketotrisporoid (**11**) (persönliche Mitteilung von Doreen Schachtschabel) als Vorstufen der Trisporsäure in *B. trispora* Flüssigkulturen verwendet wurden. Das Ketotrisporoid (**11**) wurde weiterhin als Zygophoren-induzierend in *M. mucedo* (+) Kulturen charakterisiert. Demzufolge wird das Ketotrisporoid (**11**) im natürlichen Trisporsäurestoffwechsel gebildet und kann als Pheromon zur chemischen Kommunikation über die Luft dienen.

Plempel (1957) vermutete, dass die Pheromone ein Konzentrationsgefälle aufbauen. Der Reizgradient könnte, im so genannten Zygotropismus, richtungsweisend für die Zygophoren sein, um ihre Partnerstruktur zu finden. Der Konzentrationsgradient könnte durch schnelle Oxidation an der Luft und damit Inaktivierung der Pheromone entstehen. Ein rascher, oxidativer Abbau könnte auch ein Grund dafür sein, dass der chemische Nachweis von Trisporoiden in der Gasphase erschwert wurde. Außerdem sind Pheromone in geringsten Konzentrationen wirksam und liegen möglicherweise in Mengen unterhalb der Nachweisgrenze chemischer Analyseverfahren vor.

### 5.3. Lokalisation von Carotinoiden in lebenden Pilzhypen mit Raman-Spektroskopie

Die Carotinproduktion ist ein untersuchenswerter Faktor, weil die Carotinogenese während des sexuellen Lebenszyklus von Zygomyceten, wie *B. trispora* und *M. mucedo*, induziert wird (Gooday (1968), Caglioti *et al.* (1966)). In der vorliegenden Arbeit wurde die zweidimensionale Raman-Spektroskopie für die Lokalisation von  $\beta$ -Carotin in lebenden Pilzhypen von *M. mucedo* verwendet.  $\beta$ -Carotin besitzt bei 480 nm in Aceton ein Absorptionsmaximum. Bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm wurde somit Resonanz-Raman-Spektroskopie zur Lokalisierung von  $\beta$ -Carotin durchgeführt. Durch Resonanz-Raman-Spektroskopie wurden nahezu ausschließlich  $\beta$ -Carotin-Signale gemessen.  $\beta$ -Carotin lag zu jeder Zeit und gleichmäßig verteilt in Pilzhypen vor, so dass keine Vorstufenbeschränkung für die Trisporsäure-Biosynthese entstehen konnte. Die Biosynthese könnte demzufolge jederzeit und an jeder Stelle der Hyphe induziert werden, wenn rein vom Vorkommen der biochemischen Vorstufe  $\beta$ -Carotin ausgegangen wird und andere Faktoren, wie z.B. Enzymfunktionen unberücksichtigt gelassen werden. Eine Lokalisation von Trisporsäure durch Messungen mit Resonanz-Raman-Spektroskopie war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Trisporsäure besitzt ein Absorptionsmaximum bei 325 nm, folglich wäre für die Messung eine niedrigere Anregungswellenlänge als 488 nm erforderlich. Nachteilig wäre jedoch eine Zerstörung der Probe schon bei kurzen Integrationszeiten, wegen zu hohem Energieeintrag.

Während des sexuellen Lebenszyklus ist die Zygosporangienwand reich an Sporopollenin. Das Sporopollenin entsteht vermutlich durch oxidative Polymerisierung unter anderem des  $\beta$ -Carotins und stellt ein Copolymerisat dar. Sporopollenin dient den Zygosporangien als Schutzhülle für eine unbeschadete Überdauerung z.B. im Boden.  $\beta$ -Carotin erfüllt wichtige Funktionen und ist für den Pilz unersetzlich, vor allem während des sexuellen Lebenszyklus. Der leicht erhöhte Carotingehalt an der Verschmelzungsregion von Gametangien könnte ein Hinweis sein, dass es während der sexuellen Entwicklung zu einer Verlagerung der Pheromon-Vorstufen und damit auch der Trisporoidproduktion in Richtung Hyphenspitze, also in die Nähe des Kreuzungspartners, kommt.

Schulz *et al.* (2005) verwendeten erfolgreich die zweidimensionale Fourier Transform Raman-Spektroskopie zur Lokalisation von Carotinoiden in intakten Pflanzenzellen. Die Wellenzahlen verschiedener C=C Streckschwingungen von Carotinoiden waren stark abhängig von der individuellen Anzahl konjugierter Doppelbindungen. Sie wurden auch

von terminalen Gruppen der Polyenkette beeinflusst, so wie von Interaktionen mit anderen Pflanzenbestandteilen. Bei Pflanzen wurde beobachtet (Schulz *et al.* (2005)), dass es im Raman-Spektrum von  $\beta$ -Carotin zu einer Verschiebung der Wellenzahlen kam, die Wechselwirkungen zwischen  $\beta$ -Carotin und anderen Pflanzenbestandteilen, wie Proteinen, anzeigte. Diese Wechselwirkungen zwischen  $\beta$ -Carotin und Proteinen treten möglicherweise auch in Pilzhyphen auf, da in dieser Arbeit ebenfalls eine Wellenzahlverschiebung beobachtet wurde. Cerdá-Olmedo (1987) schrieb, dass die Stimulation der Carotinogenese durch Licht bei *Phycomyces blakesleeanus* die Bildung von einem pA-Carotin-pS-Komplex benötigt, wobei pA das uncharakterisierte Genprodukt von *carA* und pS das Genprodukt von *carS* ist. Die Komplexbildung zwischen  $\beta$ -Carotin, pA und pS konnte laut Literatur nicht bei der Regulation durch Trisporoide gefunden werden. Bei der Pheromonregulation könnten andere Proteine bzw. Enzyme beteiligt sein. In *Phycomyces blakesleeanus* wurden, in Analogie zu den MAT Loci in Ascomyceten, high mobility group (HMG) domain Genloci identifiziert, die den Kreuzungstyp festlegen (Idnurm *et al.* (2008)). Möglicherweise sind die Sex-Proteine, die durch *sexM* im (-) Kreuzungstyp und durch *sexP* im (+) Kreuzungstyp codiert werden durch Pheromone bzw. Trisporinsäure reguliert. Der sex Locus könnte für Bindeproteine kodieren, die z.B. in Verbindung mit  $\beta$ -Carotin oder Trisporoiden die Transkription von Carotinauf- und -abbauenden Enzyme regulieren.

### **5.4. Entwicklung eines Biotests zur Carotininduktion in Petrischalenkulturen**

Die Raman-spektroskopischen Messungen zeigten eine regelmäßige Verteilung von  $\beta$ -Carotin in Pilzhyphen von *M. mucedo*. *B. trispora* produziert ebenfalls  $\beta$ -Carotin (Caglioti *et al.* 1966). Die in der Literatur beschriebene Stimulation der Carotin-Biosynthese in sexuell aktiven oder mit Trisporinsäure stimulierten Kulturen von *M. mucedo* bzw. *B. trispora* (Gooday 1968, Caglioti *et al.* 1966), machten die beiden Arten zu idealen Organismen für einen Biotest zur Carotininduktion. Die Erhöhung der Carotinproduktion durch Trisporinsäure-ähnliche Verbindungen, die während des sexuellen Lebenszyklus gebildet werden, wurde quantitativ bestimmt. Die chemische Struktur eines Moleküls bestimmt seine chemischen Eigenschaften, wie Ladungszustände, Hydrophobizität oder sterische Eigenschaften, und damit seine Wirkung. Durch Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurden regulativ relevante Strukturmerkmale ermittelt.

Der Biotest zur Carotininduktion ist, wie der Zygophorentest ein Biotest zur Überprüfung der Wirkung von Trisporoid-Verbindungen. Die Zygophorenbildung kann nur in wenigen Zygomycetenarten, wie *M. mucedo* und *Phycomyces blakesleeana*, beobachtet werden. Der Biotest zur Carotininduktion verwendet jedoch einen frühen und deshalb globalen Parameter mehrerer Zygomycetenarten. Erwähnt werden sollte, dass das Zählen der Zygophoren unter dem Mikroskop eine subjektive Datenermittlung darstellt, die einiger Übung bedarf, um reproduzierbare Ergebnisse zu erlangen. Die Anzahl sehr dicht stehender Zygophoren ist ungenauer bestimmbar, als von vereinzelt stehenden Strukturen. Zygophorenanzahlen über 100 sind somit mit einem größeren Fehler behaftet. Um die subjektive Auswertung durch einen robusten, quantitativ auswertbaren Test zu ersetzen, wurde der Biotest zur Carotininduktion entwickelt. Er ermöglicht eine quantifizierbare Korrelation der Carotin-induzierenden Wirkung mit Trisporoidstrukturen in unterschiedlichen Kreuzungstypen und Arten von Zygomyceten. Der Test beruht auf der HPLC-vermittelten Messung des Carotingehalts von Trisporoid-behandeltem Pilzmyzel.

Die in dieser Arbeit untersuchten Trisporoid-Verbindungen besaßen eine über 95 %-ige Reinheit. Ein geringes Restrisiko, dass mögliche Verunreinigungen eine biologische Wirkung ausübten, kann nicht ausgeschlossen werden. Die applizierten, niedrigen Konzentrationen sollten jedoch keine stark positiven Effekte erzeugen. Die Testsubstanzen waren in Ethanol bei Lagertemperaturen von 4 °C in Dunkelheit über Wochen stabil. Die Lösungen wurden in Ansätzen von maximal 15 ml hergestellt und regelmäßig erneuert, um die korrekte Konzentration der Verbindung zu gewährleisten. Die Extraktionsprozedur für den neu entwickelten Biotest zur Carotininduktion wurde für  $\beta$ -Carotin optimiert. Unterschiede im Herauslösen des  $\beta$ -Carotins aus den Zellmembranen des Pilzmyzels könnten ein Grund für mögliche Schwankungen der Werte bei einer Mehrfachwiederholung sein. Allerdings wurden die experimentellen Bedingungen gleich gehalten. Somit ist es wahrscheinlicher, dass unterschiedlich hohe Werte aus geringfügigen physiologischen Unterschieden der Pilzmyzelien, z.B. aufgrund von Wachstumsunterschieden, der unabhängigen Proben resultieren.

Bei der Wirkung der eingesetzten Trisporoide und Trisporoidanaloga ist nicht ausgeschlossen, dass die Verbindung im Pilz erst in ein anderes Zwischenprodukt oder das Endprodukt Trisporsäure umgewandelt wurde. Dann würde z.B. eigentlich die Wirkung von Trisporsäure als Endprodukt gemessen und Unterschiede in der Carotinproduktion resultierten aus unterschiedlichen Bildungsgeschwindigkeiten, je nach

Ausgangsstoff. Ob und welchen Stoffwechselschritt die applizierte Verbindung möglicherweise zuerst auslöste, war nicht nachprüfbar. Aber unabhängig davon, ob die Substanz direkt in einer Regulationskaskade wirkte oder zuerst zu einem anderen Regulator metabolisiert wurden, liefert der Test die wirksamen Strukturmerkmale des Moleküls, die im Organismus erkannt werden.

### **5.5. Trisporsäure beeinflusst die Carotinproduktion in *Mucor mucedo* und *Blakeslea trispora***

Optisch waren anhand der unterschiedlichen Gelbfärbung von Einzel- und Kreuzkulturen unterschiedliche Carotingehalte zu vermuten, die sich durch die HPLC-Messungen bestätigen ließen. Der (+) Kreuzungstyp produzierte bei *M. mucedo* und *B. trispora* mehr Carotin als der (-) Typ. Die *Mucor mucedo* Kreuzkultur bildete nach 2 Tagen die 6-fache Menge an  $\beta$ -Carotin pro Petrischale. Plempel (1965) fand heraus, dass in Flüssigkulturen mit *B. trispora* (+) mehr  $\beta$ -Carotin gebildet wurde als in (-) Kulturen und Kreuzkulturen nach 4 Tagen die 4-fache Menge anreicherten. Die Ergebnisse dieser Arbeit mit der Petrischalenkultur ähneln den Ergebnissen in Flüssigkultur.

Thomas & Goodwin (1967) berichteten, dass Trisporsäure ihre eigene Synthese über die Carotinproduktion als positiven Rückkopplungsmechanismus stimuliert. Trisporsäure würde also durch die Erhöhung der Carotinsynthese genügend Vorstufen anhäufen, um einen verstärkten Abbau zu mehr Trisporsäure zu ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Erhöhung der  $\beta$ -Carotinproduktion durch Trisporsäure-Behandlung bestätigt. Mit Trisporsäure B (**14**) wurde eine Aktivitätskurve für *M. mucedo* und *B. trispora* aufgestellt. Der (+) Kreuzungstyp von *M. mucedo* enthielt anfangs ca. 1,5-mal mehr Carotin als der (-) Typ. Bei Zugabe von 14  $\mu$ g Trisporsäure B (**14**) pro Platte erhöhte sich der Carotingehalt von *M. mucedo* (-) über den Gehalt des (+) Typs. Möglicherweise hat entweder *M. mucedo* (+) eine geringere Toleranz gegenüber der intrazellulären Carotinmenge und verhindert eine stärkere Synthese bzw. erreicht die Toleranzschwelle selbst ohne Stimulation, oder der Kreuzungstyp ist gegenüber Trisporsäure B weniger sensitiv. Wenn Trisporsäure nicht nur intrazellulär wirksam ist, sondern wie Pheromone zum komplementären Kreuzungstypen gelangt, könnte die Erklärung sein, dass der (+) Typ als Sender und der (-) Typ als Empfänger fungiert. Der Sender wäre dann unempfindlich gegenüber der gesendeten Verbindung.

Beide Kreuzungstypen von *B. trisporea* reagierten auf Trisporsäure B (14) sehr schwach. Der (+) Typ produzierte eine 10-fach höhere Carotinmenge als der (-) Typ, aber zeigte keine signifikante Erhöhung nach Behandlung mit Trisporsäure B (14). Entweder war Trisporsäure B kein Effektor für die Carotin-Biosynthese, oder die Carotinmenge in unbehandelten *B. trisporea* (+) Kulturen befand sich schon am Produktionslimit, so dass keine Neusynthese bewirkt wurde. Solch eine Endprodukt-Hemmung durch  $\beta$ -Carotin wird bei Cerdá-Olmedo (1987) beschrieben. *B. trisporea* (+) akkumuliert als Einzelkultur Trisporsäure. Entweder reguliert der Stamm dadurch seine Carotinproduktion mit der Zeit selbst hoch oder es gibt eine Gegenregulation, wie die Endprodukthemmung. Im Biotest zur Carotininduktion wurde ein fast gleich bleibender Carotingehalt bei Applikation verschiedener Trisporoide auf *B. trisporea* (+) gemessen. Ein Mechanismus zur Gegenregulation, wie die Endprodukthemmung, könnte die nicht signifikanten Änderungen der Carotinproduktion in *B. trisporea* (+) bei Trisporsäure-Gabe erklären.

### **5.6. Unterschiedliche Trisporoide erhöhen die Carotinproduktion in (+) und (-) Kreuzungstypen**

Aus der Abb. 38 ist erkennbar, dass die Carotinproduktion durch unterschiedliche Trisporoid-Verbindungen im (+) und (-) Kreuzungstyp unterschiedlich induziert wurde, also Kreuzungstyp-spezifische Wirkungen auftraten. Im (+) Kreuzungstyp von *B. trisporea* wurden keine starken Effekte hinsichtlich der Carotinproduktion erwartet, da der Pilzstamm allein Trisporsäure bilden kann (Sutter et al. (1973)) und schon eine erhöhte Carotinsynthese zeigt. Die Unempfindlichkeit von *M. mucedo* (+) lässt sich nicht mit der Eigensynthese von Trisporsäure erklären, da sie bisher noch nicht nachgewiesen wurde. Möglicherweise tritt der (+) Stamm vorwiegend als Sender der chemischen Nachricht auf und der (-) Stamm als Empfänger.

Das kooperative Synthesemodell beschreibt, dass beide Partner Pheromone senden und empfangen können (Sutter (1987)). Plempel (1957) schrieb jedoch, dass Zygomyceten des (+) Kreuzungstyps ein passiveres Verhalten zeigten als Zygomyceten des (-) Typs, die eine starke Krümmung zur Partnerstruktur beobachten ließen. Diese unterschiedliche Reaktion der Kreuzungspartner kann auf das Sender-Empfänger-Verhältnis hindeuten. Der morphologisch passivere (+) Stamm könnte als Sender und der reaktive (-) Stamm als Empfänger dienen.

## Diskussion

Beim Vergleich der Carotingehalte der beiden Kreuzungstypen von *M. mucedo* bzw. von *B. trispora* waren keine Korrelationen der Aktivitätswerte erkennbar. Um die Stärke der Carotin-induzierenden Wirkung der Trisporoidanaloga in den Kreuzungstypen darzustellen, wurden Korrelationsdiagramme angefertigt (siehe Abb.54-55). Die Achsen bezeichnen die Induktionspotentiale der Trisporoidanaloga hinsichtlich der Carotinproduktion. Eine Korrelation wäre gegeben, wenn sich die x- und y-Werte gleichen würden und sich dadurch die Werte auf einer Geraden von 45 ° zur x-Achse befänden. Die Carotin-induzierende Wirkung derselben Testsubstanz wäre dann bei beiden Kreuzungstypen gleich. Für *M.mucedo* ist eine schwache Korrelation erkennbar (Abb.54). Dennoch induzierten die Trisporoidanaloga vorwiegend in den (-) Kreuzungstypen eine verstärkte Carotinproduktion, wie bei *B. trispora* (Abb.55) deutlich sichtbar. Die Kreuzungstypen reagierten demzufolge unterschiedlich auf gleiche Trisporoide und könnten verschiedene Regulationswege besitzen. Die Kreuzungstypen einer Art können sich zwar während der sexuellen Entwicklung erkennen und dadurch als zu einer Art gehörig definiert werden, aber in ihren zellulären Regulationsmechanismen könnten Unterschiede existieren. Womöglich kommt es nicht ausschließlich zu einem Austausch von Vorstufen für die Trisporosäure-Biosynthese, sondern die Kreuzungstypen führen unterschiedliche Reaktionen durch. Die zuvor geäußerte Vermutung eines Sender-Empfänger-Verhältnisses würde diese These stützen.

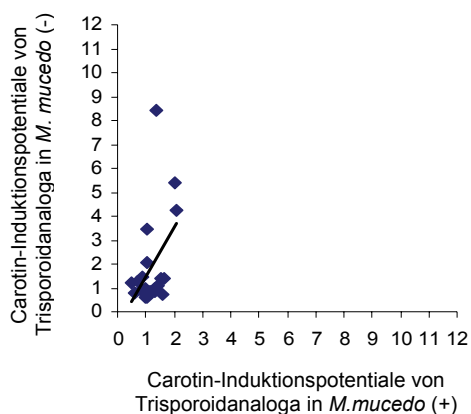


Abb.54: Der Vergleich zwischen der Carotininduktion in *M. mucedo* (+) und (-) zeigte eine schwache Korrelation der Daten. Der (-) Typ reagierte auf einige Verbindungen mit hoher Aktivität (maximaler Aktivitätswert = 8,5), während der (+) Typ eine geringe Reaktion zeigte (maximaler Aktivitätswert = 2,0).

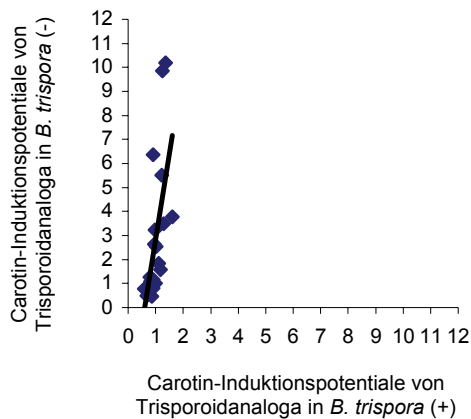


Abb.55: Der Vergleich zwischen der Carotininduktion in *B. trispora* (+) und (-) zeigte keine Korrelation der Daten. Der (-) Typ reagierte auf einige Verbindungen mit hoher Aktivität (maximaler Aktivitätswert = 10,2), während der (+) Typ keine starke Reaktion zeigte (maximaler Aktivitätswert = 2,0).

### 5.7. Unterschiedliche Trisporoide erhöhen die Carotinproduktion in *Mucor mucedo* und *Blakeslea trispora* – „Dialekte“ der chemischen Sprache während der sexuellen Interaktion

Neben den Kreuzungstyp-spezifischen Wirkungen wurden auch Art-spezifische Wirkungen hinsichtlich der Erhöhung der Carotinproduktion festgestellt. Einerseits regulierten Trisporoide aus *B. trispora* morphologische Prozesse in *M. mucedo* und bestätigten die in der Literatur beschriebene unspezifische Wirkung der Trisporoide hinsichtlich der Zygophorenbildung (Burgeff (1924)). Andererseits reagierten *M. mucedo* und *B. trispora* auf bestimmte Strukturmerkmale der Trisporoide hinsichtlich der Carotinproduktion unterschiedlich, d.h. *M. mucedo* und *B. trispora* zeigten unterschiedlich starke Carotininduktion nach Zugabe der gleichen Trisporoidanaloga. Die Korrelationsdiagramme (Abb.56) verdeutlichen, dass es keine direkten Zusammenhänge zwischen der Carotininduktion in denselben Kreuzungstypen der beiden untersuchten Arten gibt. Die unterschiedliche Wirksamkeit deutet auf eine Ausprägung von Regulationssystemen mit unterschiedlich molekularen Präferenzen in den beiden Arten aus zwei Familien der Zygomyceten hin, um z.B. Verwechslungen zwischen fremden Arten bei der Partnersuche zu vermeiden.

In der vorliegenden Arbeit bewirkte  $\beta$ -Ionon (**5**) in *B. trispora* (-) eine dreifache Erhöhung des Carotin-Normalwertes. Der stimulierende Effekt von  $\beta$ -Ionon auf die Carotin-Biosynthese von *B. trispora* wurde schon von Ciegler *et al.* (1958) beobachtet.



Chemisch verwandte Verbindungen von  $\beta$ -Ionon, wie 2,6,6-Trimethyl-1-acetylcyclohexen, erhöhten ebenfalls die Carotin-Biosynthese (Ninet *et al.* (1969)). Dandekar *et al.* (1980) beschrieben eine abnehmende Stimulationsfähigkeit der Effektoren Trisporsäure, Abscisinsäure,  $\beta$ -Ionon,  $\alpha$ -Ionon und Vitamin A. Die Länge der Seitenkette und die Anwesenheit einer Ketogruppe im Ring waren notwendig für die Carotininduktion in *B. trispora*. Wie bei Dandekar *et al.* (1980) beschrieben, ist auch in der vorliegenden Arbeit die Seitenkettenlänge in *B. trispora* für eine biologische Aktivität entscheidend. Bei den Untersuchungen waren ebenfalls Verbindungen mit einer Ketogruppe am Ring in *B. trispora* (-) aktiv, aber die aktivsten Verbindungen trugen eine Hydroxylgruppe am C(4). Diese neue Erkenntnis war aufgrund der zahlreichen neu zur Verfügung stehenden Trisporoid-Verbindungen erhalten worden. In diesem Umfang wurden bisher noch keine Experimente durchgeführt.

*M. mucedo* (+) und (-) erkannten die Ketogruppe am C(4) des Kohlenstoffrings. Die aktivsten Verbindungen trugen zusätzlich eine Keto- oder Hydroxylgruppe am C(13) der Seitenkette. Vor allem der (-) Typ reagierte stark auf Trisporoide, die als dritte funktionelle Gruppe am C(1) des Rings eine Carboxylgruppe trugen. Trisporsäure trägt alle drei funktionellen Gruppen und induzierte die höchste Carotinproduktion in beiden Kreuzungstypen. Die Endprodukte des Trisporsäurestoffwechsels lösten bei *M. mucedo* die stärksten Reaktionen aus. Dabei war Trisporsäure B (**14**) im (-) Typ aktiver und Trisporsäure C (**15**) im (+) Typ. Bei *B. trispora* (-) war ebenfalls Trisporsäure B (**14**) aktiver als C (**15**). Aber die Trisporsäuren waren in *B. trispora* weniger als halb so aktiv, wie deren Vorstufen 4-DHT C (**8**) und 4-DHMT C (**9**). Zusammenfassen lässt sich schlußfolgern, dass im Gegensatz zu *M. mucedo*, der auf die Ketogruppe am C(4) des Rings reagierte, bei *B. trispora* eine Hydroxylgruppe die stärkste Aktivität des Moleküls bestimmte. Dieser Unterschied deutet auf eine Differenzierung der chemischen Sprache der Zygomyceten hin.

Viele Zygomyceten können als Ubiquisten in derselben Umgebung existieren. Da nachweislich z.B. *M. mucedo* und *B. trispora* die Trisporsäure-Biosynthese durchführen und Trisporoide als Pheromone nutzen, wäre es sinnvoll, wenn sie eine Unterscheidung zwischen ihrer eigenen Art und einer fremden Art treffen könnten, um Verwechslungen zu vermeiden. Die Zygomycetenarten könnten z.B. Verbindungen derselben chemischen Strukturfamilie zur Kommunikation nutzen, aber durch Veränderungen z.B. von funktionellen Gruppen am Molekül eine Unterscheidung treffen. Van den Ende (1968), Sutter *et al.* (1974) und Sutter & Whitaker (1981) bewiesen ein natürliches Vorkommen

einer Mischung verschiedener Derivate von Trisporoiden in Zygomyceten. Eine Unterscheidung könnte durch die Erkennung spezifischer Derivate oder unterschiedlicher Derivat-Verhältnisse oder durch eine zeitversetzte Biosynthese geschehen.

Die (+) Kreuzungstypen beider Arten zeigten nahezu keine Induktion der Carotinproduktion nach Trisporoid-Applikation (siehe Abb.56A). Die (-) Kreuzungstypen beider Arten zeigten keine Korrelation der Carotin-Aktivitätswerte (siehe Abb.56B). Die unterschiedliche Wirksamkeit gleicher Trisporoide hinsichtlich der Carotinerhöhung in *M. mucedo* und *B. trispora* lassen die Verwendung unterschiedlicher Trisporoide zur sexuellen Kommunikation vermuten. Dieser Unterschied zwischen den Arten spricht für die Entwicklung von „Dialekten“ der chemischen Sprache während des sexuellen Lebenszyklus.

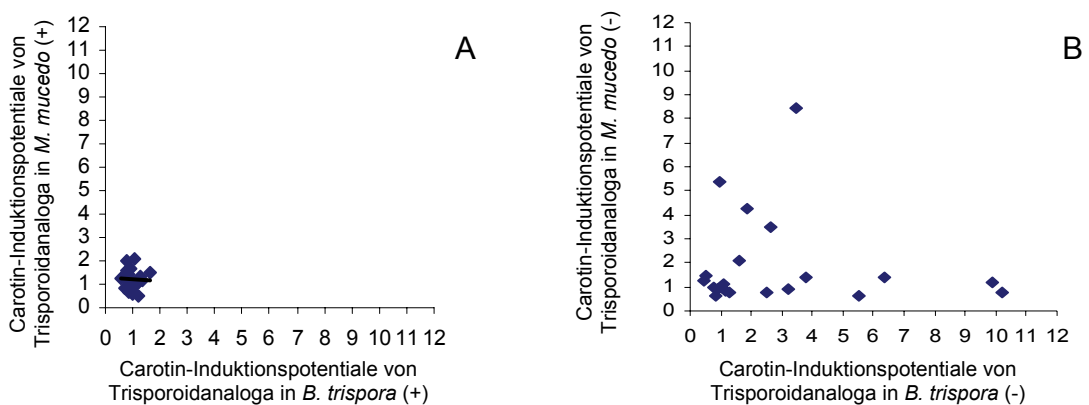


Abb.56: Der Vergleich zwischen der Carotininduktion in *B. trispora* und *M. mucedo* (+) Kreuzungstypen (A) und (-) Kreuzungstypen (B) zeigte keine Korrelation der Daten, d.h. die zwei Arten reagierten unterschiedlich auf die gleichen Trisporoid-Verbindungen.

### 5.8. Trisporoidanaloga beeinflussen die Carotinproduktion und Zygothorenbildung in *Mucor mucedo* unterschiedlich

Die Zygothorenbildung ist ein zusätzlich untersuchenswerter Faktor, weil sie als morphologische Sexualreaktion die Wirkung chemischer Verbindungen optisch beobachtbar macht. Die Ergebnisse des Zygothoren- und des Carotininduktions-Biotests bezogen sich auf 14 µg Trisporoid pro Platte, um die beiden Tests vergleichen zu können.

Trotz der geringeren Reproduzierbarkeit im Vergleich zum Biotest zur Carotininduktion stellte der Zygophoren-Biotest eine gute Möglichkeit dar, das Auslösen der morphologischen Sexualreaktion in *M. mucedo* schnell und direkt sichtbar zu machen. Der Zygophoren-Biotest wurde im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt, um ja/nein-Antworten zu bestimmen. Auch bei der Zygophorenbildung wurden, wie im Biotest zur Carotininduktion Kreuzungstyp-spezifische Reaktionen beobachtet. Z.B. löste Trisporin A (**2**), B (**3**) und C (**4**) nur in *M. mucedo* (+) und 4-DHMT C (**9**), Methyltrisporat B (**16**) und C (**17**) nur in *M. mucedo* (-) Zygophorenbildung aus. Trisporsäure B (**14**) und C (**15**) induzierte in beiden Kreuzungstypen die Zygophorenbildung. Gooday (1978) beobachtete, dass Trisporsäure in beiden Kreuzungstypen, aber Methyltrisporat ausschließlich in *M. mucedo* (-) eine Zygophorenbildung induzierte. Dieses Ergebnis wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. 4-DHMT C (**9**) induzierte nach Sutter (1987) in *M. mucedo* (-) eine Zygophorenbildung, wie auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet. Methyltrisporat B (**16**) und C (**17**) genauso wie Trisporsäure B (**14**) und C (**15**) war bei Sutter (1987) in *M. mucedo* (+) und (-) wirksam. Methyltrisporat war im (-) Typ etwa 100-fach aktiver. Bu'Lock *et al.* (1972) beobachtete eine (+) spezifische Reaktion der Zygophorenbildung auf Trisporin, Trisporol und  $\beta$ -C<sub>18</sub>-Keton. Die Kreuzungstyp-spezifischen Reaktionen bekräftigen die postulierte kooperative Synthese von Trisporsäure durch den Austausch von Vorstufen zwischen den Kreuzungspartnern (Sutter (1987)). Die Kreuzungspartner reagieren auf Verbindungen, die sie selbst nicht synthetisieren können, aber bei Aufnahme biosynthetisch zu Trisporsäure umwandeln. Sutter (1987) schrieb, dass die B-Formen im Zygophorentest aktiver waren als die C-Formen der untersuchten Trisporoide. Diese Tendenz lässt sich im quantitativen Carotininduktionstest in dieser Arbeit für *M. mucedo* nachvollziehen. In *M. mucedo* (-) induzierte Trisporsäure B (**14**) eine stärkere Carotinproduktion als Trisporsäure C (**15**). Methyltrisporat B (**16**) bewirkte eine schwache Carotinerhöhung, während Methyltrisporat C (**17**) unwirksam war. Bei *B. trispora* beträgt das Verhältnis natürlich gebildeter Trisporsäure B zu C etwa 15 zu 80 (Caglioti *et al.* (1966)). Möglicherweise wird die C-Form in größeren Mengen produziert, weil sie erst in höheren Dosen wirksam ist und die B-Form schon in geringen Spuren eine Wirkung auslöst. Das Verhältnis der Trisporsäuren bei *M. mucedo* wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben. Da *M. mucedo* aber auf die B-Form am stärksten reagierte, wäre eine geringere Produktion an Trisporsäure B erklärbar.

Die Carotinproduktion wird durch Trisporoide reguliert, die in frühe, globale Stoffwechselprozesse eingreifen. Die Zygothorenbildung wird durch spezifisch auf die morphologische Sexualantwort wirkende Trisporoide stimuliert. Die unterschiedliche Wirkung gleicher Trisporoide auf beide Reaktionen weist auf verschiedene Regulationswege von Carotinaufbau- und -abbauprozessen hin.

### **5.9. Die Transkription von *tsp3* und *carB* wird durch Trisporsäure induziert**

Die Genexpressionslevel von Enzymen sind untersuchenswert, weil dadurch transkriptionell-regulierte Gene identifiziert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde die Transkription bekannter Gene von Enzymen des Mevalonat- und des Trisporsäure-Stoffwechselweges mit real-time PCR quantitativ bestimmt (siehe Abb. 6). Das housekeeping-Gen Aktin wurde als Basis zur Berechnung der Expressionslevel verwendet. Die gemessenen Transkriptionswerte von Aktin bewegten sich bei allen Proben der gleichen Behandlung in einem konstanten Bereich. Dadurch wurde die Eigenschaft von Aktin, als gleichbleibend exprimiertes Gen, bestätigt und bei allen Messungen als Vergleichs-gen gewählt.

Vitamin A erhöht in *Phycomyces blakesleeenanus* die Carotinproduktion hauptsächlich durch Regulation auf Proteinebene neben einer geringen Transkriptionskontrolle (Ruiz-Hidalgo *et al.* (1997). Thomas *et al.* (1967) postulierten, dass erhöhte Trisporsäure-Konzentrationen in den Hyphen von *B. trispora* möglicherweise die Hemmung eines rate-limiting Enzyms aufheben könnten. Trisporsäure könnte ein Enzym enthemmen, um dadurch für ihre erhöhte Synthese zu sorgen. Der genetische Schalter könnte in diesem Fall das Ausschalten des Inhibitors bewirken. Da in der vorliegenden Arbeit die Regulation der Carotin-Oxygenase durch Trisporsäure auf transkriptioneller Ebene erstmalig nachgewiesen wurde, könnte die Carotin-Oxygenase das entscheidende rate-limiting Enzym darstellen. Der initiiierende Carotinspaltungs-Schritt könnte der Schlüsselregulator des Rückkopplungs-Mechanismus zwischen Trisporsäure und  $\beta$ -Carotin sein. Die Carotinspaltung mit Hilfe einer Carotin-Oxygenase ist ein wichtiger zellulärer Prozess in verschiedenen Organismen, wie *Fusarium fujikuroi* oder *B. trispora*. Die Carotinspaltung ist ein sehr früher Prozeß des Trisporsäure-Biosyntheseweges in Zygomyceten.

Über die zelluläre Erkennung und den Transport von Trisporsäure ist bisher nichts bekannt. Trotz entfernter Verwandtschaft haben Pilze und Wirbeltiere eukaryontische,

genetische Grundmechanismen gemeinsam. Trisporsäure ist strukturell der Retinsäure ähnlich, so dass ein ähnlicher zellulärer Erkennungs- und Transportmechanismus vermutet werden kann. Die Carotin-Oxygenase einer menschlichen Pigmentepithelzelllinie zeigt einen ähnlichen positiven Rückkopplungsmechanismus, wobei Retinsäure das als Signal wirkende Spaltprodukt ist. Retinsäure induziert die Transkription und damit den erhöhten Carotin-Oxygenase-Gehalt in den Zellen (Chichili *et al.* (2005)). Die Regulation von *tsp3* ist aufgrund eines konservierten, putativen Transkriptionsfaktor-Erkennungs-Elements in der Promoterregion möglich (Burmester *et al.* (2007)).

Die Transkription des Gens *tsp3* stieg nach Trisporsäure B (14) Behandlung innerhalb der ersten Stunde um das 500-fache in *B. trispora* (+) an und um das 100-fache in *B. trispora* (-). Der erstmalige Nachweis der transkriptionellen Regulation der putativen Carotin-Oxygenase durch Trisporsäure zeigt, dass das Enzym innerhalb des Trisporsäure-Biosyntheseweg liegt, also dem Zweck der Trisporsäureproduktion dient. Die Carotin-Oxygenase in *B. trispora* baut  $\beta$ -Carotin zu einem farblosen Produkt ab, das noch nicht näher charakterisiert wurde (Burmester *et al.* (2007)). In *Fusarium fujikuroi* wurde erstmal die Bildung von Retinal aus  $\beta$ -Carotin in einem Pilz nachgewiesen (Prado-Cabrero *et al.* (2007)). Das Gen *carX* codiert in diesem Organismus für die putative Carotin-Oxygenase. Ein  $\beta$ -Ionon-Ring im Substrat war notwendig für die Spaltungsreaktion. Retinal ist an einem negativen Rückkopplungsmechanismus beteiligt, um den Carotinoid-Biosyntheseweg zu regulieren. Retinal hat eine ähnliche chemische Struktur wie die Trisporoide und es könnte eine ähnliche regulative Wirkung durch Trisporoide auftreten. Retinal konnte bisher nicht in Flüssigkulturen von *B. trispora* identifiziert werden. Eine der Retinalwirkung entsprechende negative Regulation des Trisporsäureweges, durch gehemmte Carotinproduktion würde keinen Sinn für den Organismus in der sexuellen Vermehrungsphase machen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen eine positive Regulation der Carotinproduktion durch Trisporoide vermuten. Retinoide und Trisporoide könnten unterschiedliche Wirkungen haben. Je nach Signalsubstanz könnte die Carotin-Oxygenase positiv oder negativ beeinflusst werden. Aber auch Retinoide scheinen in Zygomyceten eher eine positive Regulation des Carotinabbaus zu bewirken. Hinweise dafür liefern die Ergebnisse der *tsp3* Transkription in *B. trispora*. Nach Applikation von Retinol konnte in *B. trispora* (+) eine erhöhter *tsp3* Transkriptlevel ( $A = 2,14$ ) gemessen werden. Der Carotinproduktionslevel veränderte sich durch Retinoid-Behandlung von *M. mucedo* und *B. trispora* Petrischalenkulturen

nicht. Die Regulationsmechanismen in Zygomyceten und *Fusarium fujikuroi* unterschieden sich wahrscheinlich voneinander.

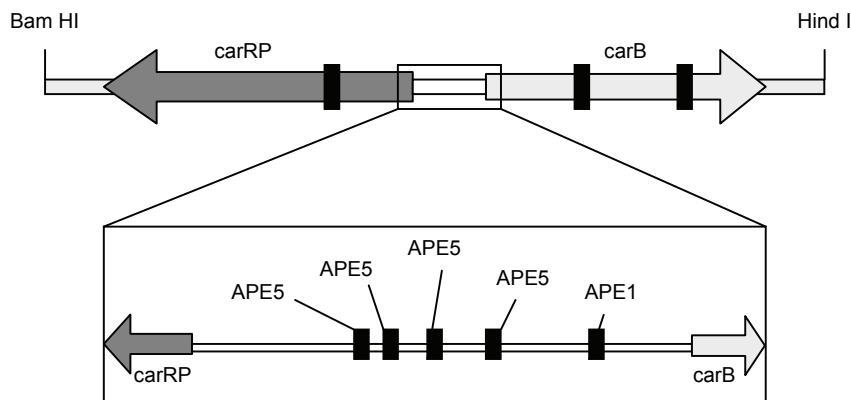
Einer der Endschr tte der Carotin-Biosynthese benötigt die Phytoen-Synthase, die durch das Gen *carRA* codiert wird und die Phytoen-Dehydrogenase, die durch das Gen *carB* codiert wird. Schmidt *et al.* (2005) beobachteten, dass in *B. trispora* Kreuzkulturen die Transkription der Gene *carB* und *carRA* im Vergleich zu Einzelkulturen stark anstieg. Die Autoren beschrieben eine Abhängigkeit der Transkriptionserhöhung von der Anwesenheit des Kreuzungspartners. Der induzierende Faktor innerhalb der Kreuzkultur wurde nicht beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass der *carB* Transkriptlevel in *B. trispora* Einzelkulturen durch die Behandlung mit Trisporsäure B (**14**) innerhalb einer Stunde um das 100-fache anstieg. Somit wurde zum ersten Mal Trisporsäure B (**14**) als ein entscheidender induzierender Faktor bestimmt. Trotz der Erhöhung der mRNA-Menge von *carB* wurde in den HPLC-Messungen zur Carotinproduktion keine zusätzliche Anreicherung von Vorstufen, wie Phytoen oder Lycopin, beobachtet. Lediglich die Carotinmenge erhöhte sich über die Zeit. Möglicherweise findet die Hauptregulation der Carotin-Biosynthese an einer früheren Stelle statt. Eventuell kommt es zu einer gleichzeitigen Hochregulierung der späten Enzyme und zu einer schnellen Umsetzung zum Endprodukt  $\beta$ -Carotin.

Ein konserviertes, putatives Transkriptionsfaktor-Erkennungselement wurde, ebenso wie bei *tsp3*, bei *carB* in der Promoterregion von *Rhizopus oryzae* gefunden (Burmester *et al.* (2007)) und weist auf eine Transkriptionsregulation hin. Rodr guez-S  iz *et al.* (2004) schrieben, dass *carB* in *B. trispora* ein Dinukleotid-Bindemotiv an der N-terminalen Region und eine Carotinoid-Bindedomäne am C-Terminus enthält. Das Carotin-Bindemotiv ist in Bakterien- und Pilzsequenzen konserviert. Transkriptionsfaktor-Erkennungselemente sind in der 5' upstream Region von *Neurospora crassa al-3* und in *carB-carRA* Promoter-Regionen von *Mucor circinelloides*, *Phycomyces blakesleeenanus* und *B. trispora* zu finden. Weitere regulative Signalsequenzen in der Promoterregion von *carB* aus *B. trispora* enthalten Bindestellen für den Ste11 Transkriptionsfaktor, ein Protein für die Induktion der sexuellen Entwicklung in *Schizosaccharomyces pombe*. Die möglichen regulativen Elemente von *carB* geben einen deutlichen Hinweis auf eine transkriptionelle Kontrolle. Die quantitative real-time PCR Messung der vorliegenden Arbeit ergab, dass die Transkriptlevel von *carB* und *tsp3* im (-) Kreuzungstyp von *B. trispora* nach Trisporsäure B (**14**) Behandlung gleich hoch lagen. Aber *B. trispora* (+) zeigte eine 5-fach stärkere Transkription am dargestellten Reaktionsmaximum nach

einer Stunde Inkubation. Das Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass *carB* und *tsp3* im (-) Kreuzungstyp zusätzlich über eine post-transkriptionelle Ebene reguliert werden, hingegen *tsp3* im (+) Kreuzungstyp ausschließlich transkriptionell. Eventuell wird auch im (+) Typ eine stärkere Reaktion ausgelöst, weil der Carotinlevel in den Hyphen einen hohen Wert hat, der bei weiterem Anstieg zum Absterben der Hyphe führen könnte. Durch schnellen und verstärkten Abbau könnte eine Überakkumulation an  $\beta$ -Carotin verhindert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass Trisporsäure B (**14**) als allgemeiner, initiierender Faktor auf der Ebene der Transkriptionskontrolle in *B. trispora* sowohl auf die Carotinogenese als auch auf den Carotinabbau wirkt. Ein weiterer regulierender Faktor der Carotinogenese ist das Licht. Die Lichtstimulation der Carotinproduktion wird in Zygomyceten bekanntermaßen auf genetischer Ebene reguliert. Dazu wurden Untersuchungen am transformierbaren Zygomyceten *Mucor circinelloides* durchgeführt (Iturriaga *et al.* (2001)). Die in der Abb.57 dargestellte Erkennungssequenz ist ein Hinweis auf eine mögliche transkriptionelle Regulation der Strukturgene *carRP* und *carB*, die für die Phytoen-Synthase und Phytoen-Dehydrogenase kodieren. Das Gen *crgA* dient als Repressor der Licht-induzierten Carotinogenese in *Mucor circinelloides*. In *B. trispora* wurde dieses Gen ebenfalls identifiziert und zeigte wie in *Mucor circinelloides* Lichtinduktion und Photoadaptation (Quiles-Rosillo *et al.* 2005). Der Mechanismus der Lichtregulation scheint in filamentösen Pilzen konserviert zu sein (Quiles-Rosillo *et al.* 2005). Möglicherweise bestehen auch Parallelen zwischen den Regulationswegen nach Licht- und Trisporoid-Stimulation in Zygomyceten. Die Signaltransduktionswege während der Pheromon- bzw. Lichterkennung in Zygomyceten sind bisher ungeklärt.

## Diskussion



*M.c.*: **APE** -3- **APE** -1- TTG -16- **APE** -2- TTG -5- TTG -15- **APE** -55- **APE** -11- TATA box

*N.c.*: **APE** -11- **APE** -3- TTG -12- TATA box

<i>M.c.</i> :	GRA	N <sub>1-4</sub>	TTG	YY
<i>N.c.</i> :	GRA	NN	TTG	CC

Abb.57: In der oberen Bildhälfte sind die Organisation von Strukturgenen der Carotin-Biosynthese von *Mucor circinelloides* und die Verteilung der APE(al-3 proximal element)-artigen Sequenz, die vermutlich an der Lichtregulation der Transkription beteiligt ist, dargestellt. In der unteren Bildhälfte ist die consensus-Sequenz von APE-artigen Sequenz von *Mucor circinelloides* (*M.c.*) und *Neurospora crassa* (*N.c.*) abgebildet. (Iturriaga et al. (2001))

Nach Zugabe von  $\beta$ -Carotin (**18**) wurde in *M. mucedo* (-) eine deutlich höhere (7-fach) und in *M. mucedo* (+) eine leicht erhöhte (2,5-fach) Carotinmenge im Vergleich zum Kontrollwert gemessen. Die Meßwerte resultierten jedoch aus dem extern zugegeben Carotin (**18**) (14  $\mu$ g/Platte).  $\beta$ -Carotin bewirkte somit keine echte Induktion der  $\beta$ -Carotinproduktion im Pilzmyzel.

Die Wirkung von  $\beta$ -Carotin auf den Carotinabbau war jedoch im Gegensatz dazu messbar. In *B. trispora* (-) erhöhte  $\beta$ -Carotin den *tsp3*-Transkriptlevel um ein 7-faches des Kontrollwertes, was auf einen echten Effekt hinweist. Das bedeutet, dass  $\beta$ -Carotin seinen eigenen Abbau induzierte. Für *B. trispora* könnte der erhöhte Carotingehalt als Signal für die erhöhte Trisporoidproduktion dienen. Somit könnte in einem Regelkreis die hohe Carotinkonzentration durch Abbau stabilisiert werden.



#### **5.10. Die Transkription von *hmgR* und *tsp1* wird nicht durch Trisporsäure beeinflusst**

Ruiz-Albert *et al.* (2002) untersuchte die Transkription von *hmgS* und *hmgR* in *Phycomyces blakesleeenanus*. Beide Gene kodieren jeweils als Einzelgen für die Enzyme HMG-CoA-Synthase und HMG-CoA-Reduktase. Der Promoter von *hmgS* enthielt im Gegensatz zu *hmgR* ein Sterol-Regulatorelement und eine putative Bindestelle für einen Transkriptionsfaktor. Die HMG-CoA-Reduktase des Mevalonat-Stoffwechselweges könnte in *Phycomyces blakesleeenanus* post-transkriptionell reguliert sein. Sterole könnten die Transkription von *hmgS* beeinflussen. Da *hmgR* als transkriptionell reguliertes Schlüsselenzym in vielen Tieren und Pflanzen bekannt ist, kann auch eine Regulation in Pilzen erwartet werden. Almeida & Cerdá-Olmedo (2007) fanden heraus, dass in Kreuzkulturen von *Phycomyces blakesleeenanus*, bei Retinol- und Dimethylphthalat-Zugabe oder Lichteinfluss keine Erhöhung der mRNA-Level von *hmgS* und *hmgR* stattfand. Die Messung der Transkription von *hmgR* nach Trisporoid-Behandlung erbrachte in der vorliegenden Arbeit keine erhöhte Transkription in *M. mucedo* und *B. trispora*. Die in dieser Arbeit getroffene Aussage, dass *hmgR* von *M. mucedo* und *B. trispora* nicht transkriptionell durch Trisporoide reguliert wird, passt zur Feststellung für *Phycomyces blakesleeenanus*, dass *hmgR* keine Regulationselemente enthält. Außerdem werden die Transkripte von *hmgS* und *hmgR* auch für weitere Terpen-Biosynthesewege, z.B. zu Sterolen oder Ubichinon, benötigt. Die Carotin-Biosynthese wird unabhängig von der übrigen Terpen-Biosynthese geregelt (Kuzina & Cerdá-Olmedo (2007)). Ob Pheromone auch andere Terpen-Biosynthesen beeinflussen wurde noch nicht untersucht.

Andererseits ist nicht auszuschließen, dass eine post-transkriptionelle Regulation stattfindet. Bisher wurden aus *M. mucedo* zwei und aus *B. trispora* drei *hmgR* Gene sequenziert. Möglicherweise existieren weitere *hmgR* Gene, die durch Trisporoide transkriptionell reguliert werden.

In dieser Arbeit wurde nach Trisporoid-Behandlung von *M. mucedo* und *B. trispora* Petrischalenkulturen keine signifikante Transkriptionserhöhung des Gens *tsp1*, das für die 4-DHMT-Dehydrogenase im Trisporsäure-Stoffwechselweg codiert, gemessen. Schimek *et al.* (2005) schrieben, dass *tsp1* post-transkriptionell reguliert ist. Das Gen wird in beiden Kreuzungstypen von *M. mucedo* abgelesen. Die Proteinaktivität findet hingegen spezifisch im (-) Kreuzungstyp statt (Schimek *et al.* (2005)). Die in der Literatur

beschriebene, post-transkriptionelle Regulation in *M. mucedo* kann, aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit, auch in *B. trispora* vorliegen.

### 5.11. Die Carotinproduktion und Carotinspaltung werden durch gleiche Trisporoide induziert

In der vorliegenden Arbeit konnten verschiedene Trisporoide, die verstärkt während des sexuellen Kreuzungsvorgangs produziert werden, als induzierende Faktoren für die *tsp3* Transkription identifiziert werden. Die Verbindungen **3** (Trisporin B) und **4** (Trisporin C) waren spezifisch im (+) Typ und die Verbindung **9** (4-DHMT C) war spezifisch im (-) Typ wirksam. Die Verbindung **14** (Trisporsäure B) aktivierte beide Kreuzungstypen. Das Ergebnis bestätigt den postulierten Biosyntheseweg, bei dem Trisporin vom (-) Typ gebildet wird und im (+) Typ als Pheromon dient bzw. 4-DHMT vom (+) Typ gebildet wird und im (-) Typ spezifisch wirksam ist.

Ob die getesteten Trisporsäure-Vorstufen erst zum Endprodukt umgewandelt werden oder gleich ihre Wirkung entfalten, ist unbekannt. Vermutet werden kann, dass Trisporsäure B (**14**) in Verbindung mit einem Bindeprotein als Transkriptionsfaktor z.B. auf die Transkription von *tsp3* wirkt. Die Kreuzungstyp-spezifische Wirkung von Trisporoidanaloga hängt vermutlich von spezifischen Rezeptoren oder Bindeproteinen ab, die bisher noch nicht nachweisbar waren.

Die Aktivitätswerte von Trisporäure B (**14**) ähnelten sich im Biotest zur Carotininduktion ( $A(\text{Carotin}) = 2,5$ ) und im Test zur Induktion der *tsp3*-Transkription ( $A(tsp3) = 3,5$ ) in *B. trispora* (-). Das Ergebnis deutet darauf hin, dass die Regulation durch Trisporäure B (**14**) in *B. trispora* (-) ausschließlich auf Transkriptionsebene stattfinden könnte. Die Aktivitätswerte von 4-DHMT C (**9**) ähnelten sich in beiden Tests ( $A(\text{Carotin}) = 1,2$ ;  $A(tsp3) = 1,8$ ) mit *B. trispora* (+). Das deutet darauf hin, dass die Regulation durch 4-DHMT C (**9**) in *B. trispora* (+) ebenfalls ausschließlich auf Transkriptionsebene stattfinden könnte. In *B. trispora* (+) könnte die Regulation durch Trisporäure B (**14**) zusätzlich auf post-transkriptioneller Ebene stattfinden, da sich die Aktivitätswerte deutlich unterscheiden ( $A(\text{Carotin}) = 17,3$ ;  $A(tsp3) = 1,3$ ). In *B. trispora* (-) könnte die Regulation durch 4-DHMT C (**9**) zusätzlich auf post-transkriptioneller Ebene stattfinden, da sich die Aktivitätswerte ebenfalls unterscheiden ( $A(\text{Carotin}) = 9,9$ ;  $A(tsp3) = 4,1$ ). Vitamin A erhöhte die Carotinproduktion in *Phycomyces blakesleeenanus* ebenfalls stärker

als die Transkription von *carB*, so dass eine vorwiegende post-transkriptionelle Regulation geschlussfolgert wurde (Ruiz-Hidalgo *et al.* (1997)).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Carotinaufbau und -abbau auf Transkriptionsebene parallel reguliert sind, wenn der Pilz Trisporoide empfängt. Die Substanzen Trisporsäure B (14) und 4-DHMT C (9) steigern gleichzeitig die Carotinproduktion und erhöhen die Transkription des Carotinspaltungsgens *tsp3*. Vermutlich gibt es eine regulatorische Kopplung der Carotinauf- und Carotinabbauprozesse in *B. trispora*. Das vermehrt zur Verfügung gestellte  $\beta$ -Carotin kann dann gleichzeitig in erhöhtem Maße zur Trisporsäure-Biosynthese durch oxidative Spaltung verfügbar gemacht werden. Die gleichzeitige Regulation der Gene für den Carotinaufbau und die Carotinspaltung ermöglichen eine erhöhte Trisporsäure-Biosynthese aus der Vorstufe  $\beta$ -Carotin in beiden Kreuzungstypen von *B. trispora*. Der Vergleich von Carotingehalten mit Transkriptleveln nach Trisporoidbehandlung zeigte im (-) Kreuzungstyp eine sehr schwache Korrelation der Regulation von Carotinauf- und -abbau (siehe Abb.59). Durch eine korrelierte Regulation könnten mehr Vorstufen für die Trisporsäure-Biosynthese verfügbar gemacht und verstärkt abgebaut werden. Der positive Rückkopplungsmechanismus zwischen  $\beta$ -Carotin und Trisporsäure (Thomas & Goodwin (1967)) wird dadurch bestätigt.

Der Vergleich der Transkriptlevel nach Trisporoidapplikation in *B. trispora* (+) und (-) ergab keine Korrelation zwischen den Kreuzungstypen (siehe Abb.58). Die Kreuzungstypen scheinen unterschiedlich reguliert zu sein. Das spricht dafür, dass sie unterschiedliche Trisporoide als Pheromone erkennen, was den postulierten Biosyntheseweg bestätigt, bei dem unterschiedliche Trisporoide zwischen (+) und (-) Partnern ausgetauscht werden.

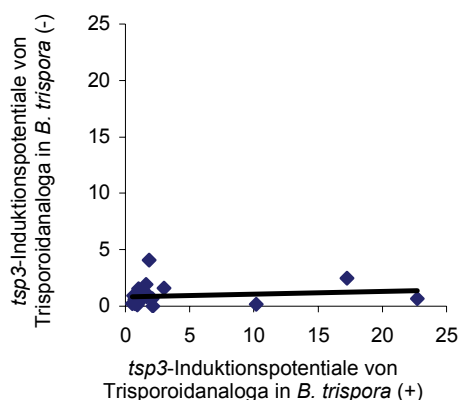


Abb.58: Der Vergleich zwischen den Aktivitätswerten der *tsp3*-Transkriptlevel von *B. trispora* (+) und (-) zeigte keine Korrelation der Daten. Die zwei Kreuzungstypen reagierten unterschiedlich auf die gleichen Trisporoid-Verbindungen, wobei der (+) Typ stärker reagierte als der (-) Typ. Das Ergebnis entspricht der umgekehrten Situation des Carotininduktions-Tests, bei dem der (-) Typ stärker reagiert.

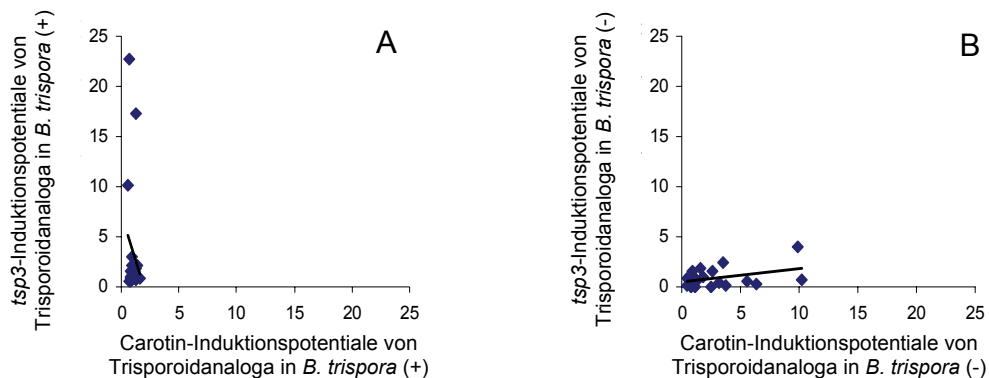


Abb.59: Der Vergleich zwischen den Aktivitätswerten der Carotinproduktion und *tsp3*-Transkriptlevel von *B. trispora* (+) (A) und *B. trispora* (-) (B) zeigte keine Korrelation der Daten. Im (+) Typ wurde die Transkription des Carotinabbau-Gens deutlich stärker reguliert, als der Carotinaufbau. In *B. trispora* (-) wurde der Carotinaufbau etwas stärker reguliert, als die Transkription des Carotinabbau-Gens. Die Daten für den (-)Typ deuten eine sehr schwache Korrelation zwischen Carotinauf- und -abbau an.

Die Transkription von *carB* und *tsp3* wurde innerhalb einer Stunde induziert. Die Gentranskriptionslevel erreichten nach 6 h einen gleichbleibenden Wert. Diese gleichzeitige Transkriptionsänderung kann für eine gleichzeitige Regulation des Carotinauf- und -abbaus sprechen. Die Transkriptionsänderungen waren bereits nach 1 Stunde messbar, aber die Carotinproduktion stieg erst nach frühestens 24 h signifikant an. Diese Zeitdifferenz könnte auf eine zusätzliche Regulation hindeuten.

Die höheren Transkriptlevel für *tsp3* im Vergleich zu *carB* sprechen für eine verstärkte Induktion des Carotinabbaus, um in erhöhter Produktion von Trisporinsäure zu enden. Jedoch können aufgrund der real-time PCR-Daten keine definitiven Aussagen zu Umsetzungsraten der Enzyme getroffen werden, die nicht der Transkriptionsrate entsprechen müssen.

### 5.12. Induzierende Strukturmerkmale der Trisporoidmoleküle während des Carotinaufbaus und -abbaus in *Mucor mucedo* bzw. *Blakeslea trispora* unterscheiden sich

Einige Verbindungen induzierten deutlich höhere Carotinmengen oder Transkriptlevel als andere. Diese Verbindungen mit hohem Induktionspotential dürfen jedoch nicht als stärkste, natürlich verwendete Signalmoleküle beschrieben werden, da hierzu zusätzlich die tatsächliche Konzentration der Trisporoide in der Kultur bekannt sein müsste. Alle

## Diskussion

hier dargestellten Ergebnisse hängen von den experimentellen Bedingungen im Labor ab. Die Zusammensetzung des Mediums, die Temperatur und Lichtverhältnisse wurden konstant gehalten, um reproduzierbare Bedingungen zu gewährleisten. Dem natürlichen System wurde sich angenähert, indem die Pilzstämme auf festem Nährboden wuchsen und nicht in Flüssigkultur. Bei der folgenden Auswertung wurde deshalb nicht die Höhe des Induktionspotentials berücksichtigt, sondern alle nach dem Aktivitätswert als aktiv definierten Verbindungen gleich betrachtet. Die dabei am häufigsten auftretenden Strukturelemente wurden als Aktivitätsprinzip zusammengefasst.

Auffällig war, dass alle Zygophoren-induzierenden Verbindungen auch die Carotinproduktion von *M. mucedo* im jeweiligen Kreuzungstyp erhöhten. Wenn die Zygophorenbildung als Merkmal des Carotinabbaus definiert wird, wurden in *M. mucedo* der Auf- und Abbau von  $\beta$ -Carotin durch gleiche Trisporoid-Verbindungen reguliert. Einige Trisporoide induzierten ausschließlich den Carotinaufbau. Die am stärksten Carotin-induzierenden Verbindungen induzierten auch die Zygophorenbildung. Im (+) Kreuzungstyp war Verbindung **15** und im (-) Typ Verbindung **14** am stärksten Carotin-induzierend wirksam (siehe Tab.7). Zwischen Carotinauf- und -abbau in *M. mucedo* lassen sich Gemeinsamkeiten der regulatorischen Strukturelemente erkennen.

Tab.7: Die Beeinflussung des Carotinaufbaus und -abbaus in *M. mucedo* durch unterschiedliche Trisporoid-Verbindungen ist tabellarisch nach abnehmender Induktion des Carotinaufbaus aufgelistet.

Carotin-Aufbau		Carotin-Abbau	
<i>M. mucedo</i> (+)	<i>M. mucedo</i> (-)	<i>M. mucedo</i> (+)	<i>M. mucedo</i> (-)
15	14	15	14
13	15	2	15
2	16	14	16
12	17	3	17
10	6	4	9
14	12	11	
3	13		
4	19		
11	9		
8	10		
7			
17			
16			

Alle Carotin-induzierenden Verbindungen induzierten auch die *tsp3*-Transkription in *B. trispora* (+) bzw. alle *tsp3*-Transkription-induzierenden Verbindungen induzierten

## Diskussion

ebenfalls die Carotinproduktion im (-) Typ. Im (+) Kreuzungstyp war Verbindung **12** und im (-) Typ Verbindung **8** am stärksten Carotin-induzierend wirksam (siehe Tab.8). Im (+) Kreuzungstyp war Verbindung **8** und im (-) Typ Verbindung **9** am stärksten *tsp3*-Transkription-induzierend wirksam. Einige Trisporoide induzierten ausschließlich die *tsp3*-Transkription in *B. trispora* (+) bzw. die Carotinproduktion in *B. trispora* (-). Wenn die *tsp3*-Transkription als Merkmal des Carotinabbaus definiert wird, sind Unterschiede in den regulatorischen Strukturelementen für Carotinauf- und -abbau in *B. trispora* erkennbar.

Tab.8: Die Beeinflussung des Carotinaufbaus und -abbaus in *B. trispora* durch unterschiedliche Trisporoid-Verbindungen ist tabellarisch nach abnehmender Induktion des Carotinauf- und -abbaus aufgelistet.

Carotin-Aufbau		Carotin-Abbau	
<i>B. trispora</i> (+)	<i>B. trispora</i> (-)	<i>B. trispora</i> (+)	<i>B. trispora</i> (-)
12	8	3	9
8	9	14	14
14	13	4	17
9	7	20	18
7	12	8	15
17	14	9	
15	5	15	
21	16	19	
	21	17	
	15	21	
	17	5	
	2	18	
	11		
	10		

Carotinaufbau und Merkmale des Carotinabbaus wurden durch Trisporoid-Verbindungen reguliert. Die Zusammenfassung der Ergebnisse der Biotests zur Carotininduktion, Zygothorenbildung und *tsp3*-Transkription für alle aktiven Verbindungen ergab das allgemeine Aktivitätsprinzip der Trisporoide für den Carotinauf- und -abbau (siehe Abb. 60). Als Maß für den Carotinabbau wurde nicht die Trisporinsäureproduktion in Analogie zur Carotinproduktion gemessen, sondern für *M. mucedo* das morphologische Merkmal der Zygothorenbildung genutzt und für *B. trispora* die *tsp3*-Transkription verwendet. Diese Parameter wurden als Carotinabbau-Merkmale definiert und deren Ergebnisse flossen in die zusammenfassende Darstellung der Aktivitätsprinzipien ein (siehe Abb. 60). Dabei ist zu beachten, dass die Regulation der Transkription von *tsp3* nicht die

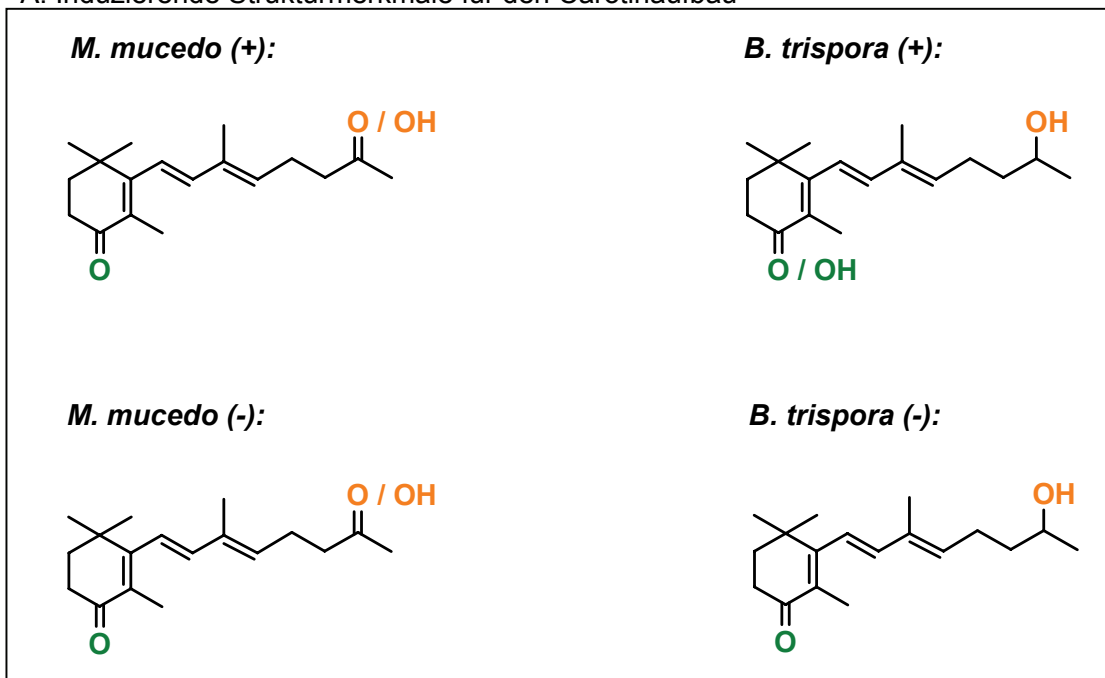
tatsächliche Regulation der Carotin-Oxygenase beschreiben muß, aber eine erste Orientierung liefert.

Sowohl der Carotinaufbau als auch der Carotinabbau wurden durch unterschiedliche Strukturmerkmale induziert. Während in *M. mucedo* die Keto- oder Hydroxylgruppe am C(13) den Carotinaufbau förderte, ermöglichte ausschließlich die Ketogruppe in *M. mucedo* (+) und die Hydroxylgruppe in *M. mucedo* (-) den verstärkten Carotinabbau. Die Ketogruppe am C<sub>6</sub>-Ring war für die Induktion des Carotinauf- und -abbaus gleich wichtig. In *M. mucedo* (-) und *B. trispora* (-) wurde zusätzlich die funktionelle Gruppe am C(1) für den Carotinabbau bedeutsam. Die Abb.60 verdeutlicht, dass induzierende Strukturmerkmale für den Carotinaufbau zwischen den Kreuzungstypen ähnlicher sind als zwischen den Arten. Die induzierenden Strukturmerkmale für den Carotinabbau ähneln sich zwischen den Arten stärker als zwischen den Kreuzungstypen. Die Kreuzungstypen könnten unterschiedliche Regulationswege oder unterschiedliche Stoffwechselwege zur Trisporsäure-Biosynthese aufweisen.

Das Strukturelement, das in allen Pilzstämmen aktivierend auf den Carotinaufbau und Carotinabbau wirkte, war die Ketogruppe am C(4), die nur in *B. trispora* (+) auch gegen eine Hydroxylgruppe ausgetauscht werden konnte. Die funktionellen Gruppen am C(1) und C(13) waren für spezifische Reaktionen in den Arten und Kreuzungstypen entscheidend.

Die in dieser Arbeit ermittelten Aktivierungspotentiale von Trisporoidverbindungen ermöglichen einen gezielten Einsatz zur Stimulation von Carotinauf- und Carotinabbauprozessen in zukünftigen Untersuchungen. Die ermittelten Struktur-Wirkungs-Beziehungen können Hinweise geben, welche Bedeutung natürlich vorkommende Trisporoide spielen. In zukünftigen metabolischen Studien zur Trisporsäure-Biosynthese können sie Rückschlüsse z.B. auf Funktionen neu entdeckter Metabolite gestatten.

A: Induzierende Strukturmerkmale für den Carotinaufbau



B: Induzierende Strukturmerkmale für den Carotinabbau

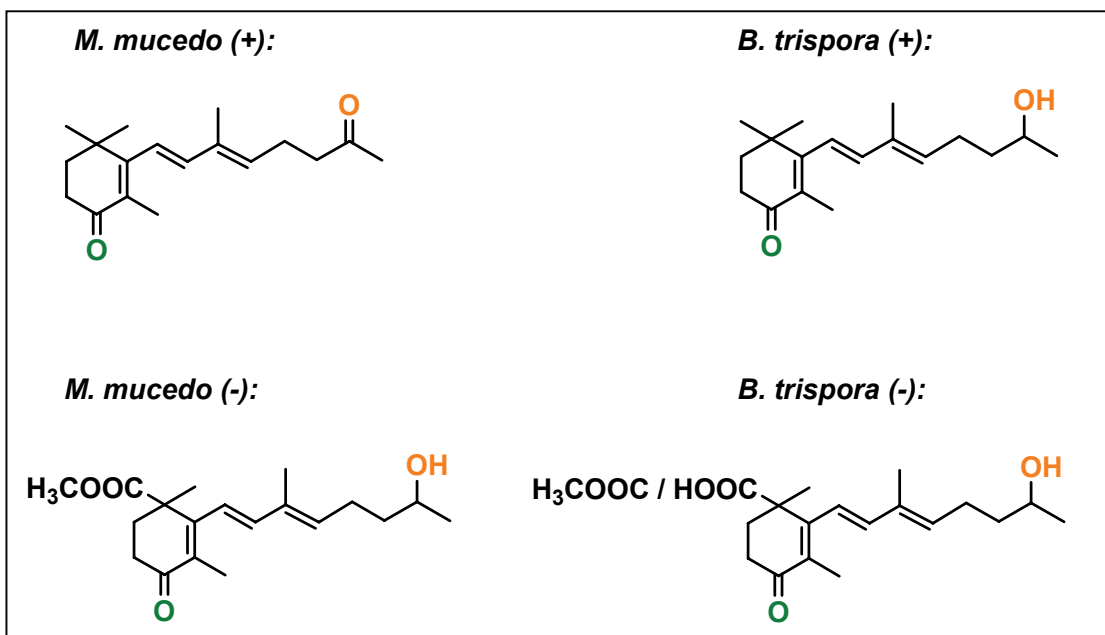


Abb.60: Darstellung der chemischen Strukturmerkmale der Trisporoidmoleküle, die den Carotinaufbau (A) bzw. Carotinabbau (B) induzieren. Daraus ergibt sich das allgemeine Aktivitätsprinzip für *M. mucedo* und *B. trispora*. Die Ketogruppe am C<sub>6</sub>-Ring ist in jedem Fall induktiv wirksam. Für die Induktion des Carotinaufbaus ist keine weitere funktionelle Gruppe am Ring nötig. In den meisten Fällen wirkt die Hydroxylgruppe am C(13) der Seitenkette induktiv. Für den Carotinabbau im (-) Kreuzungstyp ist die Carboxyl- bzw. Estergruppe von Bedeutung.



## 6. Literatur

- Almeida, E.E.A., Cerdá-Olmedo, E. (2008) Gene expression in the regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Curr. Genet.* 2008 Jan 9 [Epub ahead of print]
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. (1993) Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 7915-22.
- Austin, D.J., Bullock, J.D., and Drake, D. (1970) The biosynthesis of trisporic acids from  $\beta$ -carotene via retinal and trisporol. *Experientia* **26**: 348-349.
- Austin, D.J., Bullock, J.D., and Gooday, G.W. (1969) Trisporic acids: sexual hormones from *Mucor mucedo* and *Blakeslea trispora*. *Nature, London* **223**: 1178-1179.
- Bahn, Y., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J.C., Heitman, J., and Cardenas, M.E. (2007) Sensing the environment: lessons from fungi. *Nature Reviews* **5**: 57-69.
- Banbury, G.H. (1954) Processes controlling zygomorph formation and zygotropism in *Mucor mucedo*. *Nature, Lond.* **173**: 499-500.
- Bauernfeind, J. C. (1981). *Carotenoids as Colorants and Vitamin a Precursors*. Academic Press, New York.
- Büch, K., Stransky, H., Bigus, H.J., and Hager, A. (1994) Enhancement by artificial electron acceptors of thylacoid lumen acidification and zeaxanthin formation. *J. Plant Physiol.* **144**: 641-648.
- Bullock, J.D., Drake, D., and Winstanly, D.J. (1972) Specificity and transformations of trisporic acid series of fungal sex hormones. *Phytochemistry* **11**: 2011-2018.
- Bullock, J.D., Jones, B.E., and Winskill, N. (1974) Structures of the mating-type-specific prohormones in *Mucorales*. *Journal of the Chemical Society D-Chemical Communications* **17**: 708-709.
- Burgeff, H. (1924) Untersuchungen über Sexualität und Parasitismus bei Mucorineen. I. *Botanische Abhandlungen* **4**: 1-135.
- Burmester, A., Richter, M., Schultze, K., Voelz, K., Schachtschabel, D., Boland, W. et al. (2007) Cleavage of beta-carotene as the first step in sexual hormone synthesis in zygomycetes is mediated by a trisporic acid regulated beta-carotene oxygenase. *Fungal Genetics and Biology* **44**: 1096-1108.
- Caglioti, L., Cainelli, G., Camerino, B., Mondelli, R., and Pietro, A. (1966) The structure of trisporic-C acid. *Tetrahedron Letters* **7**: 175-187.
- Cerdá-Olmedo, E. (1987) Carotene. In *Phycomyces*. Cerdá-Olmedo, E., Lipson, E.D. (ed). Cold Spring Harbor, New York, pp. 199-222.
- Casselton, L.A. (2002) Mate recognition in fungi. *Heredity* **88**: 142-147.

- Chichili, G., Nohr, D., Schäffer, M., von Lintig, J., and Biesalski, H. (2005) beta-Carotene conversion into vitamin A in human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**: 3562-3569.
- Choi, J.K., Holzer, S., Chacko, S.A., Lin, Z.X., Hoffman, R.K., Holzer, H. (1991) Phorbol esters selectively and reversibly inhibit a subset of myofibrillar genes responsible for the ongoing differentiation program of chick skeletal myotubes. *Mol Cell Biol.* **11**: 4473-4482
- Ciegler, A., Arnold, M., and Anderson, R.F. (1958) Microbiological Production of Carotenoids IV. Effects of Various Grains on Production of Beta-Carotene by Mated Strains of *Blakeslea trispora*. *Appl. Microbiol.* **7**: 94-98.
- Combet, E., Henderson, J., Eastwood, D.C., and Burton, K.S. (2006) Eight-carbon volatiles in mushrooms and fungi: properties, analysis, and biosynthesis. *Mycoscience* **47**: 317-326.
- Dandekar, S., Modi, V., and Jani, U. (1980) Chemical regulators of carotenogenesis by *Blakeslea trispora*. *Phytochemistry* **19**: 795-798.
- Evans, R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**: 889-895.
- Faldt, J., Jonsell, M., Nordlander, G., and Borg-Karlson, A.K. (1999) Volatiles of bracket fungi *Fomitopsis pinicola* and *Fomes fomentarius* and their functions as insect attractants. *Journal of Chemical Ecology* **25**: 567-590.
- Fiedler, K., Schutz, E., and Geh, S. (2001) Detection of microbial volatile organic compounds (MVOCs) produced by moulds on various materials. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **204**: 111-121.
- Gessler, N.N., Sokolov, A.V., and Belozerskaya, T.A. (2002) Initial stages of trisporic acid synthesis in *Blakeslea trispora*. *Applied Biochemistry and Microbiology* **38**: 536-543.
- Gooday, G.W. (1968) Hormonal control of sexual reproduction in *Mucor mucedo*. *New Phytology* **67**: 815-821.
- Gooday, G.W. (1978) Functions of trisporic acid. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **284**: 509-520.
- Gooday, G.W. (1994) Hormones in mycelial fungi. In *The Mycota 1*: Springer-Verlag, pp. 401-411.
- Heisenberg, M., and Cerdá-Olmedo, E. (1968) Segregation of Heterokaryons in Asexual Cycle of *Phycomyces*. *Molecular and General Genetics* **102**: 187-195.
- Herskowitz, I. (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **52** : 536-553.
- Herskowitz, I. (1989) A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast. *Nature* **342**: 749-757.

- Hunter, T. and Karin, M. (1992) The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* **70**: 375-387.
- Idnurm, A., Walton, F.J., Floyd, A., Heitman, J. (2008) Identification of the sex genes in an early diverged fungus. *Nature* **451**: 193-196
- Iturriaga, E.A., Velagos, A., Eslava, A.P., and Alvarez, M.I. (2001) The genetics and molecular biology of carotenoid biosynthesis in *Mucor*. *Recent Res. Devel. Genet.* **1**: 79-92.
- Jacob, F. and Monod, J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **3**: 318-356.
- Johnson, P.F. and McKnight, S.L. (1989) Eucaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **58**: 799-839.
- Kuzina, V., Domenech, C., and Cerda-Olmedo, E. (2006) Relationships among the biosyntheses of ubiquinone, carotene, sterols, and triacylglycerols in Zygomycetes. *Arch Microbiol.* **186**: 485-93
- Kuzina, V. & Cerdá-Olmedo, E. (2007) Ubiquinone and carotene production in the Mucorales *Blakeslea* and *Phycomyces*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 991-999
- Livak, K., and Schmittgen, T. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Lucas, P.C. and Granner, D.K. (1992) Hormone response domains in gene transcription. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 1131-1173.
- McKenna, N.J., and O'Malley, B.W. (2001) Nuclear Receptors, Coregulators, Ligands, and Selective Receptor Modulators - Making Sense of the Patchwork Quilt. *Annals of the New York Academy of Sciences* **949**: 3-5.
- Mesland, D.A.M., Huisman, J.G., and Vandenen.H (1974) Volatile Sexual Hormones in *Mucor mucedo*. *Journal of General Microbiology* **80**: 111-117.
- Mosandl, A., Heusinger, G., Gessner, M. (1986) Analytical and sensory differentiation of 1-octen-3-ol enantiomers. *J Agric Food Chem* **34**:119–122.
- Murillo, F.J., and Cerda-Olmedo, E. (1976) Regulation of Carotene Synthesis in *Phycomyces*. *Molecular & General Genetics* **148**: 19-24.
- Nabeta, K., Nishimori, I., Sato, S., and Sugisawa, H. (1980) Volatile constituents of plus and minus strains of *Blakeslea trispora*. *Phytochemistry* **19**: 1133-1135.
- Nieuwenhuis, M., and Van den Ende, H. (1975) Sex specificity of hormone synthesis in *Mucor mucedo*. *Arch. Microbiol.* **102**: 167-169.
- Ninet, L., Renaut, J., and Tissier, R. (1969) Activation of Biosynthesis of Carotenoids by *Blakeslea trispora*. *Biotechnology and Bioengineering* **11**: 1195-1210.

Nordlund, D.A. (1981) In *Semiochemicals: Their Role in Pest Control*. Wiley, New York, pp. 13-28.

Pierce, A.M., Pierce, H.D., Borden, J.H. & Oehlschlager, A.C. (1989) Production dynamics of cucujolide pheromones and identification of 1-octen-3-ol as a new aggregation pheromone for *Oryzaephilus surinamensis* and *O. mercator*. *Environmental Entomology*, **18**: 747 – 755.

Pierce, A.M., Pierce, H.D., Borden, J.H., and Oehlschlager, A.C. (1991) Fungal Volatiles-Semiochemicals for Stored-Product Beetles (Coleoptera, Cucujidae). *Journal of Chemical Ecology* **17**: 581-597.

Plempel, M. (1957) Die Sexualstoffe der *Mucorineae*. Ihre Abtrennung und die Erklärung ihrer Funktion. *Archiv für Mikrobiologie* **26**: 151-174.

Plempel, M. (1962) Die Zygotropische Reaktion bei Mucorineen III. Mitteilung. *Planta* **58**: 509-520.

Plempel, M. (1963) Die chemischen Grundlagen der Sexualreaktion bei Zygomyceten. *Planta* **59**: 492-508.

Plempel, M., and Dawid, W. (1961) Die Zygotropische Reaktion bei Mucorineen II. Mitteilung. *Planta* **56**: 438-446.

Quiles-Rosillo, M., Ruiz-Vazquez, R., Torres-Martinez, S., and Garre, V. (2005) Light induction of the carotenoid biosynthesis pathway in *Blakeslea trispora*. *Fungal Genet. Biol.* **42**: 141-153.

Riley, G.J.P., and Bramley, P.M. (1976) Subcellular-Distribution of Carotenoids in *Phycomyces-Blakesleeanus* C115 Car-42 Mad-107(-). *Biochimica Et Biophysica Acta* **450**: 429-440.

Rodriguez-Saiz, M., Paz, B., De La Fuente, J.L., Lopez-Nieto, M.J., Cabri, W., and Barredo, J.L. (2004) *Blakeslea trispora* genes for carotene biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5589-5594.

Prado-Cabrero, A., Scherzinger, D., Avalos, J., and Al-Babili, S. (2007) Retinal Biosynthesis in Fungi: Characterization of the Carotenoid Oxygenase CarX from *Fusarium fujikuroi*. *Eucaryotic Cell* **6**: 650-657.

Rodriguez-Saiz, M., Paz, B., De La Fuente, J.L., Lopez-Nieto, M.J., Cabri, W., and Barredo, J.L. (2004) *Blakeslea trispora* genes for carotene biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5589-5594.

Ruiz-Albert, J., Cerda-Olmedo, E., and Corrochano, L.M. (2002) Genes for mevalonate biosynthesis in *Phycomyces*. *Molecular Genetics and Genomics* **266**: 768-777.

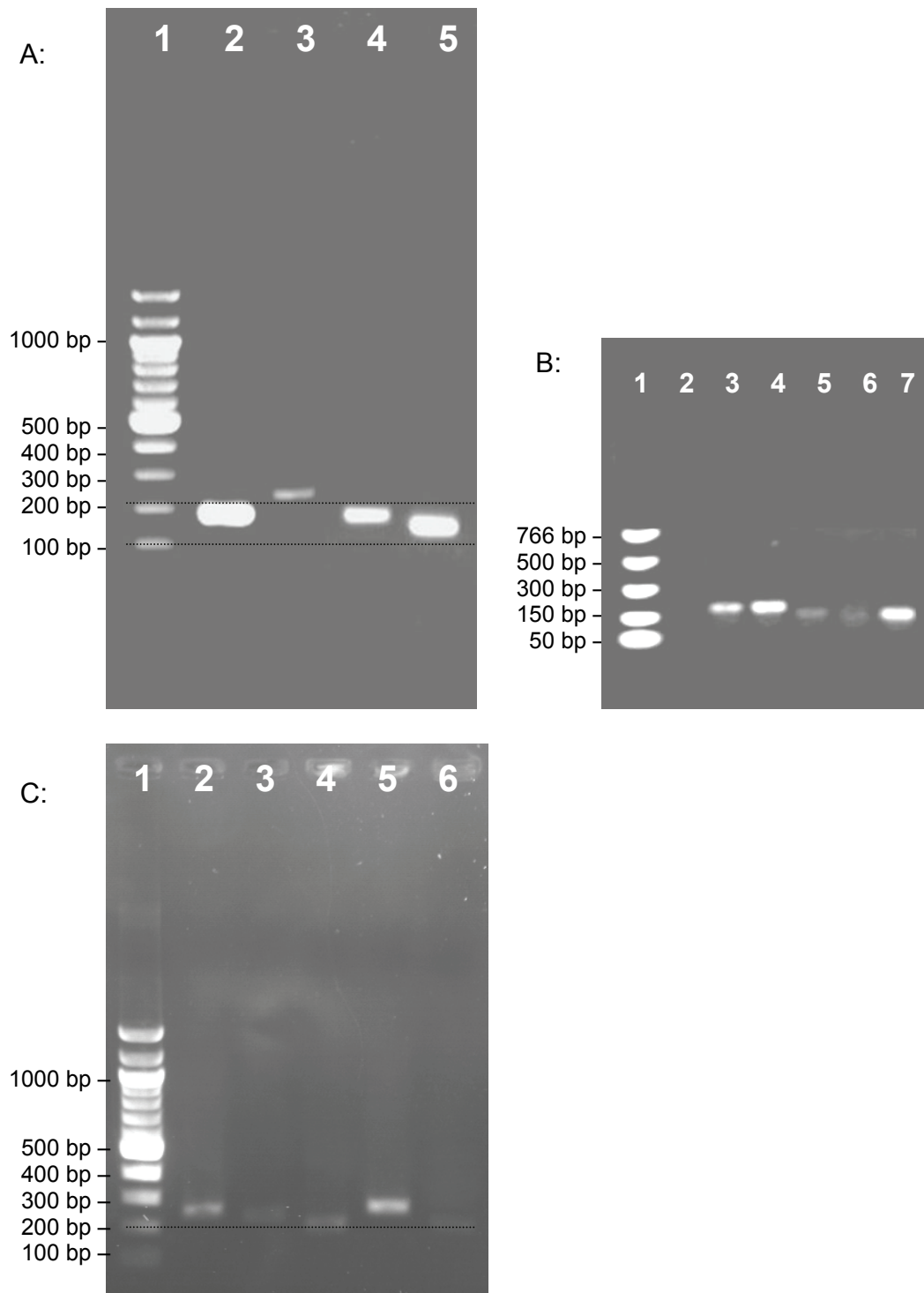
RuizHidalgo, M.J., Benito, E.P., Sandmann, G., and Eslava, A.P. (1997) The phytoene dehydrogenase gene of *Phycomyces*: Regulation of its expression by blue light and vitamin A. *Molecular & General Genetics* **253**: 734-744.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Sandmann, G., and Misawa, N. (2002) Fungal Carotenoids. In *The Mycota X Industrial Applications*. Osiewacz, H.D. (ed). Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, pp. 247-262.
- Schachtschabel, D., Schimek, C., Wostemeyer, J., and Boland, W. (2005) Biological activity of trisporoids and trisporoid analogues in *Mucor mucedo* (-). *Phytochemistry* **66**: 1358-1365.
- Schachtschabel, D., and Boland, W. (2007) Efficient generation of a trisporoid library by combination of synthesis and biotransformation. *Journal of Organic Chemistry* **72**: 1366-1372.
- Schimek, C., Kleppe, K., Saleem, A.-R., Voigt, K., Burmester, A., and Woestemeyer, J. (2003) Sexual reactions in *Mortierellales* are mediated by the trisporic acid system. *Mycological Research* **107**: 736-747.
- Schimek, C., Petzold, A., Schultze, K., Wetzel, J., Wolschendorf, F., Burmester, A., and Wostemeyer, J. (2005) 4-Dihydromethyltrisporate dehydrogenase, an enzyme of the sex hormone pathway in *Mucor mucedo*, is constitutively transcribed but its activity is differently regulated in (+) and (-) mating types. *Fungal Genetics and Biology* **42**: 804-812.
- Schmidt, A.D., Heinekamp, T., Matuschek, M., Liebmann, B., Bollschweiler, C., and Brakhage, A.A. (2005) Analysis of mating-dependent transcription of *Blakeslea trispora* carotenoid biosynthesis genes *carB* and *carRA* by quantitative real-time PCR. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology* **67**: 549-555.
- Schnürer, J., Olsson, J., and Börjesson, T. (1999) Fungal Volatiles as Indicators of Food and Feeds Spoilage. *Fungal Genetics and Biology* **27**: 209-217.
- Schulz, H., Baranska, M., and Baranski, R. (2005) Potential of NIR-FT-Raman spectroscopy in natural carotenoid analysis. *Biopolymers* **77**: 212-221.
- Seeman, N.C., Rosenberg, J.M. and Rich, A. (1976) Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 804-808.
- Stensmyr, M.C., Giordano, E., Balloi, A., Angioy, A.M., and Hansson, B.S. (2003) Novel natural ligands for *Drosophila* olfactory receptor neurones. *Journal of Experimental Biology* **206**: 715-724.
- Sutter, R.P., Capage, D.A., Harrison, T.L., and Keen, W.A. (1973) Trisporic acid biosynthesis in separate plus and minus cultures of *Blakeslea trispora*: identification by Mucor assay of two mating-type-specific components. *Journal of Bacteriology* **114**: 1074-1082.
- Sutter, R.P. (1975) Mutations affecting sexual development in *Phycomyces blakesleeanus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**: 127.
- Sutter, R.P. (1987) *Sexual Development*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press.

- Sutter, R.P., and Whitaker, J.P. (1981) Zygospore-stimulating precursors (pheromones) of trisporic acids active in (-)-*Phycomyces blakesleeanus*. *The Journal of Biological Chemistry* **256**: 2334-2341.
- Sutter, R.P., Harrison, T.L., and Galasko, G. (1974) Trisporic acid biosynthesis in *Blakeslea trispora* via type-specific precursors. *The Journal of Biological Chemistry* **249**: 2282-2284.
- Thomas, D.M., and Goodwin, T.W. (1967) Studies on Carotenogenesis in *Blakeslea trispora*. I. General Observations on Synthesis in Mated and Unmated Strains. *Phytochemistry* **6**: 355-360.
- Thomas, D.M., Harris, R.C., Kirk, J.T.O., and Goodwin, T.W. (1967) Studies on Carotenogenesis in *Blakeslea trispora*. 2. Mode of Action of Trisporic Acid. *Phytochemistry* **6**: 361-366.
- Van den Ende, H. (1968) Relationships between sexuality and carotene synthesis in *Blakeslea trispora*. *Journal of Bacteriology* **96**: 1298-1303.
- Van den Ende, H. (1976) In *Sexual Interactions in Plants - The role of specific substances in sexual reproduction*. London, New York, San Francisco: Academic Press, pp. 1-76.
- Versele, M., Lemaire, K., and Thevelein, J.M. (2001) Sex and sugar in yeast: two distinct GPCR systems. *EMBO reports* **2**: 574-579.
- Webster, J. (1983) *Pilze: Eine Einführung*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Werkman, B.A. (1976) Localisation and partial characterisation of a sex-specific enzyme in homothallic and heterothallic *Mucorales*. *Archives of Microbiology* **109**: 209-213.
- Wostemeyer, J. (1985) Strain-Dependent Variation in Ribosomal DNA Arrangement in *Absidia glauca*. *European Journal of Biochemistry* **146**: 443-448.
- Yamamoto, K.R. (1985) Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu. Rev. Genet.* **19**: 209-252.
- Zawel, L. and Reinberg, D. (1993) Initiation of transcription by RNA polymerase II: a multi-step process. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **44**: 68-108.
- Zycha, H. (1935) *Kryptogamenflora der Mark Brandenburg / Pilze II: Mucorineae*. Leipzig: Verlag von Gebrüder Borntraeger.

## 7. Anhang

PCR mit Primern (siehe Tab.I) für die real-time PCR:



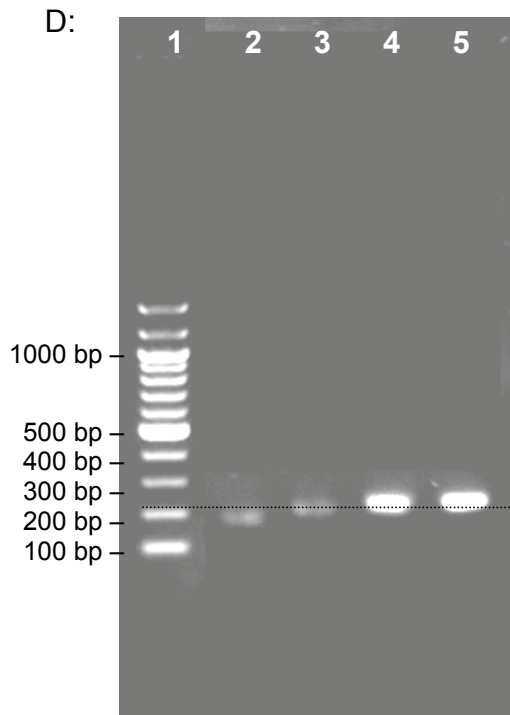


Abb. I: Nachweis der Produktlängen der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese. Die PCR-Produkte wurden mit den in Tab.I dargestellten Primern gewonnenen.

**A: Gelelektrophorese von *M. mucedo* PCR-Produkten.** Nachweis der PCR-Produkte aus cDNA von *M. mucedo* (-) mit den Primern für *act*, *hmgR1*, *hmgR2* und *tsp1* auf einem 1,5 %-igen Agarose-Gel ergab die erwarteten Produktlängen; 1: 100 bp DNA Leiter (NEB), 2: *act*, 3: *hmgR2*, 4: *hmgR1*, 5: *tsp1*

**B: Gelelektrophorese von *M. mucedo* real-time PCR-Produkten.** Ermittlung der optimalen Primerkonzentration für die real-time PCR mit cDNA von *M. mucedo* (+) (mit 10µg/Platte Trisporensäuren aus Pilzextrakt behandelt) und Nachweis auf einem 1,5 %-igen Agarose-Gel ergab 100 ng *act* und 100 ng *tsp1* ; 1: PCR Marker (NEB), 2: 25 ng *act*, 3: 50 ng *act*, 4: 100 ng *act*, 5: 25 ng *tsp1*, 6: 50 ng *tsp1*, 7: 100 ng *tsp1*

**C: Gelelektrophorese von *B. trispora* real-time PCR-Produkten.** 1,5%-iges Agarose-Gel ausgewählter real-time PCR-Produkte mit cDNA von unbehandelten *B. trispora* (-) Kulturen und den Primern *carB*, *hmgR*, *act* und *tsp3* zeigt die erwarteten Produktlängen; 1: 100 bp DNA Leiter (NEB), 2: *act*, 3: *hmgR*, 4: *carB*, 5: *tsp3*, 6: *tsp1*

**D: Gelelektrophorese von *B. trispora* real-time PCR-Produkten.** 1,5%-iges Agarose-Gel ausgewählter real-time PCR-Produkte mit cDNA von Trisporin B-behandelten *B. trispora* (+) Kulturen und den Primern *carB*, *hmgR*, *act* und *tsp3* zeigt die erwarteten Produktlängen; 1: 1 kb DNA Leiter (NEB), 2: *carB*, 3: *hmgR*, 4: *act*, 5: *tsp3*



**Berechnung der Bandengrößen im Gel:**

Bandenabstand auf DNA-Leiter [mm] / 100 bp =  
gemessener Abstand [mm] / x (+Ausgangsbandengröße)

Bsp.: 5 mm / 100 bp = 3 mm / x

x = 60 bp + 200 bp = 260 bp

Tab.I: Primer-Sequenzen, PCR-Produktlängen und am Gel berechnete Produktlängen;  
Mm = *M. mucedo*, Bt = *B. tripora*, vor = Vorwärts-Primer, rück = Rückwärts-Primer, *act* = Aktin-Gen, *carB* = Phytoen-Dehydrogenase-Gen, *hmgR* = HMG-CoA-Reduktase-Gen, *tsp1* = 4-DMHT-Dehydrogenase-Gen, *tsp3* = Carotin-Oxygenase-Gen

Primernamen	Sequenz (5' zu 3')	Produktlänge(bp) / errechnete Produktlänge(bp)	
Mm act vor	cgt gct cct gaa gct ctc tt		
Mm act rück	ctt ctg cat acg gtc agc aa	181	190
Mm hmgR1 vor	tgg ctt cta cag cca gag gt		
Mm hmgR1 rück	acc cgt cac aat tgc ttc tc	170	190
Mm hmgR2 vor	acg gaa ggt tgt ttg att gc		
Mm hmgR2 rück	gcc att gca acc ttc atc tt	242	250
Mm tsp1 vor	cca agc tct gga aca cct tc		
Mm tsp1 rück	agt cac gac cag cca tat cc	144	150
Bt act vor	ccc gtt ctc ttg act gaa gc		
Bt act rück	agt cac gac cag cca tat cc	250	258
Bt hmgR vor	tgc cag agg ttg taa agc aa		
Bt hmgR rück	gac tag acg acc ggc aag ag	229	230
Bt carB vor	cgc ttg cac ttg ttt ggt aa		
Bt carB rück	cat gtt gaa acc acc acg ag	192	210
Bt tsp3 vor	att ggt cat cct ttc gat gg		
Bt tsp3 rück	act cgg gat cat gtt ctt gc	247	260
Bt tsp1 vor	gcc aag act ttg acc ttg ga		
Bt tsp1 rück	ccc act tga cca aac gat ct	211	210

## Sequenzierung der Primer-Produkte:

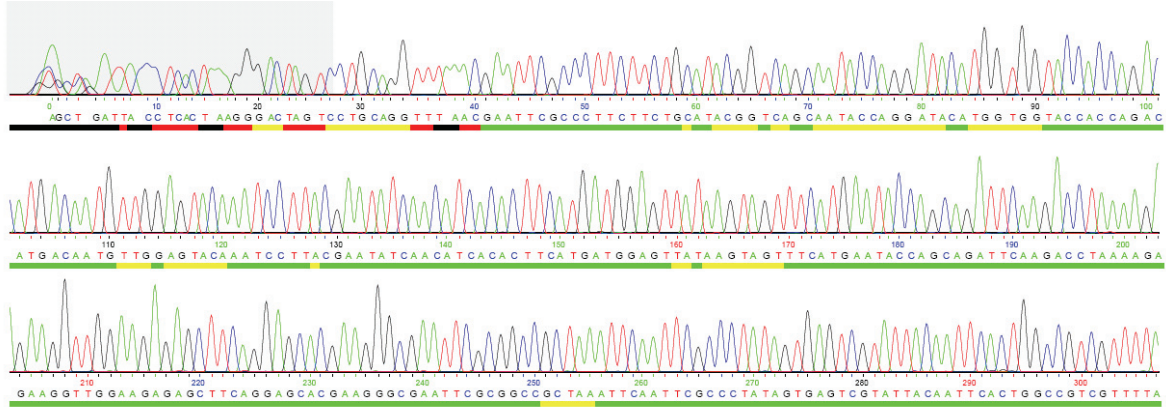


Abb.II: Ausschnitt aus dem Sequenzierungsergebnis für *M. mucedo act*. Beim Vergleich mit der Sequenz des *act* Gens traten 11 unterschiedliche Nukleotide an den Stellen 85, 86, 116, 122, 131, 164, 167, 170, 176, 182, 197 auf.

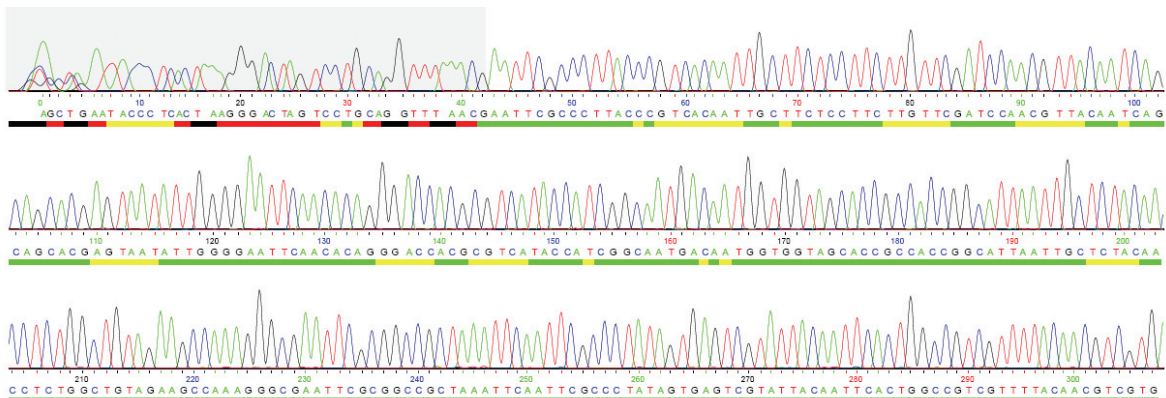


Abb.III: Ausschnitt aus dem Sequenzierungsergebnis für *M. mucedo hmgR1*. Beim Vergleich mit der Sequenz des *hmgR1* Gens traten 4 unterschiedliche Nukleotide an den Stellen 93, 145, 146, 198 auf.

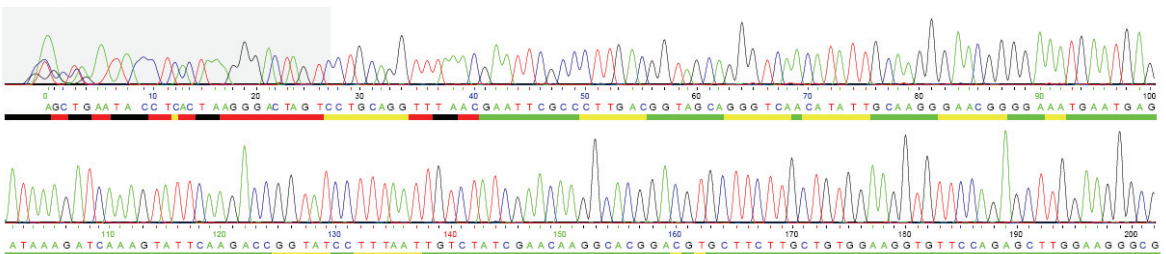


Abb.IV: Ausschnitt aus dem Sequenzierungsergebnis für *M. mucedo tsp1*. Beim Vergleich mit der Sequenz des *tsp1* Gens traten keine unterschiedliche Nukleotide auf.

## Anhang

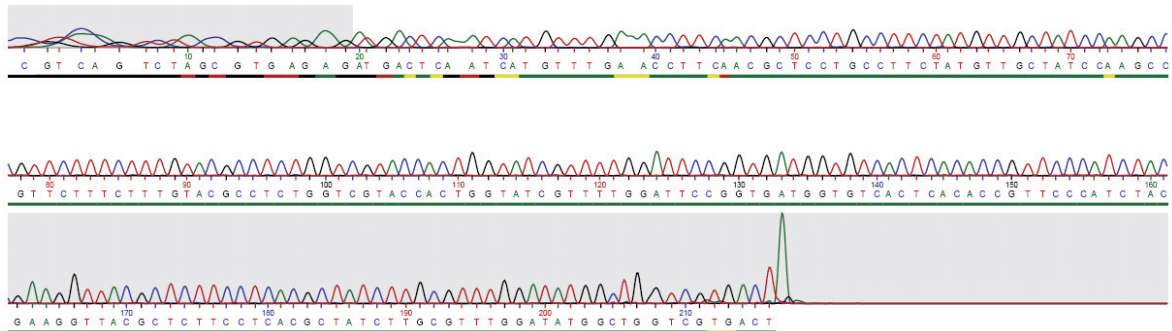


Abb.V: Ausschnitt aus dem Sequenzierungsergebnis für *B. trispora act*. Beim Vergleich mit der Sequenz des *act* Gens traten keine unterschiedliche Nukleotide auf.

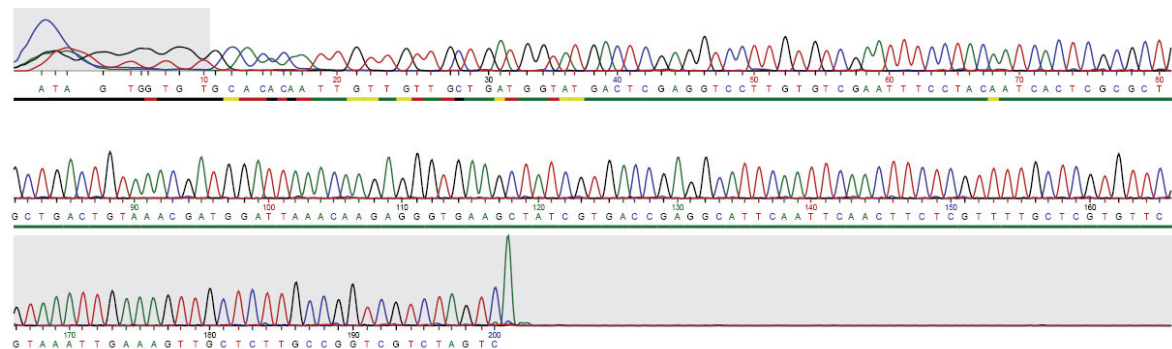


Abb.VI: Ausschnitt aus dem Sequenzierungsergebnis für *B. trispora hmgR*. Beim Vergleich mit der Sequenz des *hmgR* Gens traten keine unterschiedliche Nukleotide auf.

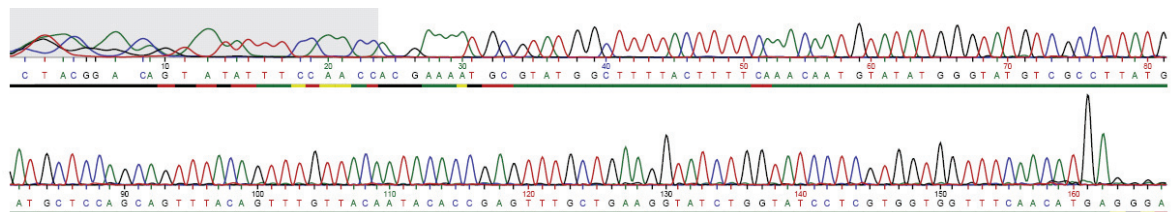


Abb.VII: Ausschnitt aus dem Sequenzierungsergebnis für *B. trispora carB*. Beim Vergleich mit der Sequenz des *carB* Gens traten keine unterschiedliche Nukleotide auf.

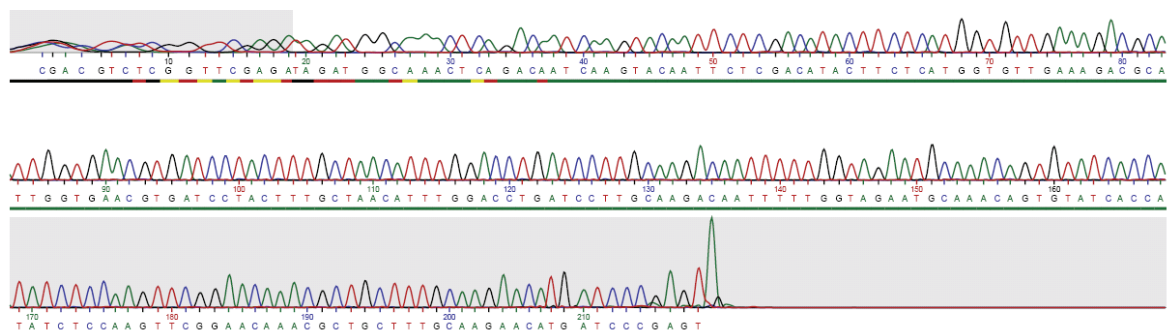


Abb.VIII: Ausschnitt aus dem Sequenzierungsergebnis für *B. trispora tsp3*. Beim Vergleich mit der Sequenz des *tsp3* Gens traten keine unterschiedliche Nukleotide auf.

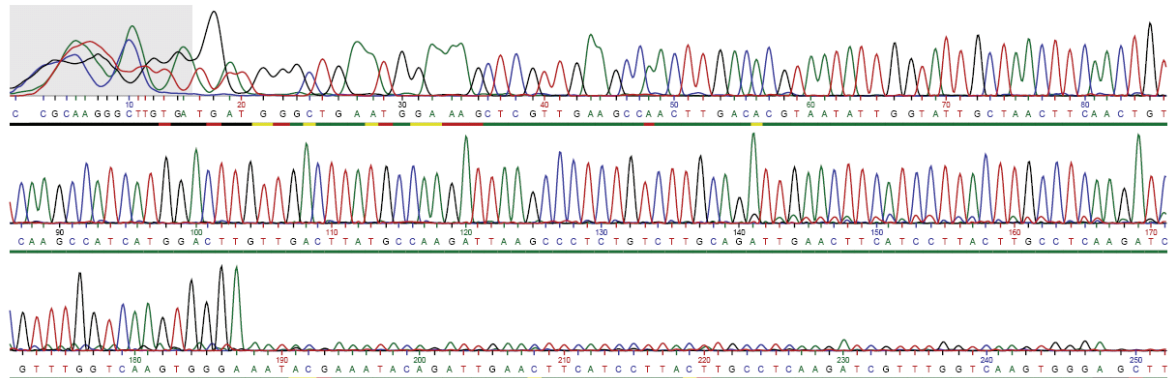


Abb.IX: Ausschnitt aus dem Sequenzierungsergebnis für *B. trispora tsp1*. Beim Vergleich mit der Sequenz des *tsp1* Gens traten keine unterschiedliche Nukleotide auf.

## Danksagung

Ich bedanke mich bei allen die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere bei Herrn **Prof. Dr. Wilhelm Boland** für die kontinuierliche Unterstützung während meiner Promotion. Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Wilhelm Boland für die Möglichkeit, in einer sehr professionellen und freundlichen Arbeitsatmosphäre der Abteilung für Bioorganische Chemie am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, meine Dissertation anfertigen zu können.

Bei Herrn **Prof. Dr. Johannes Wöstemeyer** vom Lehrstuhl für Allgemeine Mikrobiologie und Mikrobengenetik der Friedrich-Schiller-Universität Jena möchte ich mich für die Möglichkeit der Kooperationsarbeit und Betreuung meiner Promotion bedanken.

**Doreen Schachtschabel** danke ich ganz herzlich für die zahlreichen Fachgespräche, die zur Ideenbildung und Problemlösung beitrugen sowie für die Synthesen und Reinigungen der Trisporoidanaloge, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn **Dr. Axel Mithöfer** danke ich für seine engagierte Beratung und die hilfreichen, wissenschaftlichen Gespräche.

Bei Frau **PD Dr. Christine Schimek** bedanke ich mich für die wissenschaftliche Betreuung, Anregungen und Ratschläge.

Meinen Bürokollegen **Sabrina Discher, Matthias Funke, Kerstin Ploß, Karla Tolzin-Banasch, Antje Burse, Roy Kirsch, Sindy Frick** und auch **Jeannette Kley** danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Der ehemaligen Nachwuchsgruppe von Herrn **Prof. Dr. Georg Pohnert**, insbesondere **Thomas Wichard** und **Ulrich Lion**, danke ich für die anfängliche Hilfe im Umgang mit den Analysegeräten der Abteilung für Bioorganische Chemie.

**Regina Stieber** und **Rebecca Wagner** danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung als studentische Hilfskräfte im Labor.

Herrn **Prof. Dr. Jürgen Popp** danke ich für die Möglichkeit am Institut für Physikalische Chemie und am Institut für Photonische Technologien in Jena die Raman-spektroskopischen Messungen durchführen zu können. **Ute Neugebauer, Diana Cialla** und **Katharina Hering** danke ich dabei für ihre Anleitung und Unterstützung bei den Raman-spektroskopischen Messungen.

Weiterhin danke ich allen **Mitarbeitern der Abteilung für Bioorganische Chemie** für die gute Zusammenarbeit.

Mein ganz besonderer Dank geht an meinen Freund **Dr. med. Thomas Bitter** und an **meine Eltern** dafür, dass sie mich immer und in jeder Situation unterstützt haben, und meiner **Oma Marianne** danke ich für ihre unendliche Hilfsbereitschaft.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und dass nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet wurden.

Jena, den 05.02.2008

.....

Mareike Richter

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Mareike Richter, geboren am 22.04.1980, dass mir die Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist. Die vorliegende Dissertation „Wirkungsweise sexueller Signalstoffe der Zygomyceten *Blakeslea trispora* (Choanaeophoraceae) und *Mucor mucedo* (Mucoraceae)“ wurde von mir selbstständig angefertigt und es wurden keine anderen außer den angegebenen Hilfsmitteln, persönlichen Mitteilungen und Quellen benutzt. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen. Es wurden von mir keine geldwerten Leistungen erbracht, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Diese Dissertation wurde bei dem Fakultätsrat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena und an keiner anderen Stelle zur wissenschaftlichen Prüfung oder zur Dissertation eingereicht.

Jena, den 05.02.2008

.....

Mareike Richter



Promotion am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena  
in der Abteilung Bioorganische Chemie von Prof. Dr. W. Boland

Abschluß als Diplom-Biologin an der Friedrich-Schiller-Universität  
(FSU) Jena

Diplomarbeit mit dem Thema „Biochemische und physiologische Charakterisierung kreuzungsdefekter Mutanten des Zygomyceten *Absidia glauca*“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Wöstemeyer am Institut für Mikrobiologie der FSU Jena

Studentische Hilfskraft an der FSU Jena

Studium der Biologie (Schwerpunkte: Mikrobiologie, Medizinische Mikrobiologie, Mikrobielle Phytopathologie) an der FSU Jena

allgemeine Hochschulreife

Friedrich-Schiller-Gymnasium in Weimar

Hoffmann-von-Fallersleben-Gymnasium in Weimar

Albert-Schweitzer-Grundschule in Weimar

## Wissenschaftliche Beiträge

### Vorträge

- 11/2007 Präsentation zur „Langen Nacht der Wissenschaften“ Jena 2007
- 10/2006 1<sup>st</sup> meeting “Biology of Yeasts and Filamentous Fungi” (VAAM), Frankfurt, Germany
- 03/2006 Annual Conference of the Association of General and Applied Microbiology (VAAM), Jena, Germany
- 11/2005 Präsentation zur „Langen Nacht der Wissenschaften“ Jena 2005
- 11/2005 3<sup>rd</sup> Biannual IMPRS Symposium / MPI for Chemical Ecology, Jena, Germany
- 09/2004 1<sup>st</sup> Biannual IMPRS Symposium / MPI for Chemical Ecology, Jena, Germany

### Poster

- 09/2007 IMPRS evaluation / MPI for Chemical Ecology, Jena, Germany
- 07/2007 23<sup>rd</sup> International Society of Chemical Ecology Annual Meeting, Jena, Germany
- 03/2007 XXIV. Fungal genetics conference / Asilomar Conference Center, California, USA
- 11/2006 5<sup>th</sup> Biannual IMPRS Symposium / MPI for Chemical Ecology, Jena, Germany
- 10/2006 SAB Meeting 2006 / MPI for Chemical Ecology, Jena, Germany
- 06/2006 ICE Symposium / MPI for Chemical Ecology, Jena, Germany
- 04/2006 European Conference of Fungal Genetics, Vienna, Austria
- 06/2006 ICE Symposium / MPI for Chemical Ecology, Jena, Germany
- 09/2005 Molecular Biology of Fungi (VAAM), Bochum, Germany
- 03/2005 2<sup>nd</sup> Biannual IMPRS Symposium / MPI for Chemical Ecology, Jena, Germany
- 01/2004 ICE Symposium / MPI for Chemical Ecology, Jena, Germany

**Publikationen**

- 08/2007      Burmester, A., Richter, M., Schultze, K., Voelz, K., Schachtschabel, D.,  
Boland, W., Wöstemeyer, J., Schimek, C. (2007) Cleavage of  $\beta$ -carotene  
as the first step in sexual hormone synthesis in zygomycetes is mediated  
by a trisporic acid regulated  $\beta$ -carotene oxygenase; Fungal Genetics and  
Biology
- 03/2006      Richter, M. (2006) The chemical language in sexuality of zygomycetes;  
Bio Spektrum Tagungsband Elsevier

Jena, den 05.02.2008

.....  
Mareike Richter